



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.LP

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS BIOLOGICAS

**ESTUDIOS SOBRE EL ROL DEL AGUA DE HIDRATACION
EN LA ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA HEMOGLOBINA**

ANDRES GERARDO SALVAY

2001



BOEACIUR

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-8977/79 int. 129



DEX-57134

Ficha

Inv. 8

89

2-54/138



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIOS SOBRE EL ROL DEL AGUA DE HIDRATACION
EN LA ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA HEMOGLOBINA**

ANDRES GERARDO SALVAY

2001



Este trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado en el Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB), en la ciudad de La Plata, bajo la dirección del Profesor Doctor José Raúl Grigera y con el auspicio de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

a Berta y Tito

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer aquí a aquellas personas que me ayudaron en la realización de este trabajo.

Quiero agradecer al Profesor Dr. J. Raúl Grigera, por haberme enseñado a dar los primeros pasos en el mundo de la investigación científica y por haber aceptado la dirección de esta tesis; de él quiero destacar su paciencia y optimismo, como así también sus permanentes enseñanzas. De la misma manera quiero agradecer al Profesor Dr. Marcio F. Colombo, su ayuda fue vital para el desarrollo de este trabajo, a él quiero agradecerle la oportunidad que me otorgó al invitarme a trabajar un tiempo en su laboratorio; no sólo me brindó sus conocimientos, sino que también me brindó su amistad.

También quiero agradecer a mis compañeros del grupo de biofísica del IFLYSIB, a Inés, Graciela, Juan, Cristina, Eduardo, Viviana, Néstor, y Federico; ellos permanentemente me ayudaron en la convivencia diaria con sus consejos y conceptos a lo largo de todo este período. Al Ingeniero De Orzola, quien me auxilió en la construcción del circuito eléctrico que es parte del experimento. A los demás compañeros del IFLYSIB; a Rosa, por su amabilidad y auxilio siempre disponible; a Lola, por su cariño y cuidado; a Rubén, por su permanente disponibilidad y amistad; a Darío, por su buena disposición y auxilio; al Dr. Víctor Kuz, por sus enseñanzas; al Dr. Fernando Vericat, por su permanente apoyo; a Danilo, Ileana, Manuel, y Luis, por el continuo aliento y compañía; a Silvia y Mónica, por sus auxilios en computación. También agradezco a los compañeros que ahora están lejos, a Anabella y Ernesto.

Quiero también expresar mi profundo agradecimiento a mis compañeros del laboratorio de espectroscopia del Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas IBILCE de São José do Rio Preto; a Bernardete, Renato, Osmar, Flávio, Ocimar, Alexandre, Priscilla, Sandra, y Adriana; ellos, además de enseñarme, alentarme y ayudarme, me brindaron todo su cariño y amistad durante mi estadía en Brasil. Quiero agradecer también a los técnicos Paulinho y Barbosa, quienes participaron en la construcción del dispositivo experimental; como así también a los Drs. Marcelo Fossay, Gustavo Bonilla-Rodrigues, João Ruggiero Neto, José Roberto Ruggiero, y Johnny Rizzieri, quienes me ayudaron a lo largo de mi estadía

en el IBILCE. En fin quiero agradecer a toda la congregación del IBILCE, la que me recibió y me hizo sentir como en mi casa.

Quiero agradecer también a la gente del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular IBBM de la ciudad de La Plata, quienes en más de una oportunidad permitieron que utilice sus aparatos experimentales.

Por último quiero agradecer a la Srta. Alejandra Zapata, quien a lo largo de todo este período, en mas de una oportunidad, me aclaró el panorama.

A todos ellos, y a todas las demás personas que no nombré y que directa e indirectamente ayudaron en la concreción de este trabajo, muchas gracias.

Andrés G. Salvay

La Plata, mayo de 2001.

PREFACIO

El agua es un elemento clave en los sistemas biológicos, juega un rol esencial en los aspectos estructurales y procesos dinámicos de las biomacromoléculas. Los efectos del agua sobre la estructura y el control funcional de proteínas aún no son bien conocidos, siendo así necesario el desarrollo de nuevos métodos experimentales de investigación.

La hemoglobina (Hb) es una macromolécula prototipo para el estudio de la relación estructura-función en proteínas. En este trabajo estudiamos el rol del agua de hidratación en la estructura y función de la Hb. A tal efecto, desarrollamos un método experimental que permite determinar simultáneamente el contenido de agua en la proteína, y la conformación asociada a tal hidratación. De esta manera, investigamos como el agua está involucrada en la estabilización de estructuras de la Hb, y como contribuye a la función transportadora de oxígeno de esta proteína.

INDICE

PREFACIO	vi
1- INTRODUCCION	1
1.1) Hemoglobina y mioglobina	7
1.1.1) Estructura	7
1.1.2) Función	11
2- MATERIALES Y METODOS	17
2.1) Muestras	17
2.1.1) Purificación de la hemoglobina	17
2.1.2) Obtención de meta-hemoglobina	20
2.1.3) Preparación de meta-mioglobina	21
2.1.4) Reducción de meta-mioglobina	21
2.2) Experimento	23
2.2.1) Medidas espectrofotométricas	23
2.2.2) Microbalanza de cuarzo	25
2.2.3) Dispositivo experimental	27
2.3) Análisis de datos	29
2.3.1) Análisis cinético	29
2.3.2) Isotermas de sorción de vapor de agua. Tratamiento mecánico-estadístico	32
3- RESULTADOS	37
3.1) Agua y estructura	37
3.1.1) Cinética de la transición meta-Hb ⇌ hemicromo inducida por la cantidad de agua de hidratación	37
3.1.2) Isotermas de sorción de vapor de agua y curvas de equilibrio para meta-Hb/ hemicromo en función de la humedad relativa y de la hidratación	44
3.1.3) Hidratación de meta-Mb	50
3.2) Agua y función	51
3.2.1) Medidas de la cantidad de agua de hidratación para desoxi y oxi-Hb en presencia y en ausencia de Cl ⁻	52
3.2.2) Medidas de la cantidad de agua de hidratación para desoxi y oxi-Mb	59
4- CONCLUSIONES	63
4.1) Discusiones	63
4.1.1) Agua y estructura	63
4.1.2) Agua y función	74
4.2) Conclusiones finales	80
REFERENCIAS	84

1- Introducción

El agua juega un rol fundamental en los sistemas biológicos. La estructura funcional de las proteínas solubles depende de la interacción con el medio circundante. De todas las sustancias con capacidad de interactuar con una proteína (iones, moléculas, y macromoléculas) el agua es la más abundante en el medio biológico, siendo además uno de los pocos y muchas veces el único componente que siempre mantiene contacto con la proteína. Estos contactos desempeñan un papel fundamental en la estructuración y conformación proteica. Definida la estructura primaria de la proteína, es decir su secuencia de aminoácidos, sus otras estructuras superiores son inducidas por la interacción con el solvente (Tanford, 1973). Como regla general los residuos de aminoácidos hidrofóbicos tienden a ser mantenidos en el interior de la proteína, ocultos al solvente, mientras que los residuos hidrofílicos se encuentran en la superficie macromolecular, en contacto con el agua (Rupley, Gratton, & Careri, 1983).

Los aspectos conformacionales y funcionales de la proteína, impuestos por el agua, es uno de los problemas relevantes para el estudio del rol biológico del agua.

Asociada a la imposición de la estructura de la proteína por el agua, la proteína también determina la estructuración del agua en su vecindad. Esto quiere decir que el agua que circunda la proteína posee características estructurales, dinámicas, y termodinámicas, alteradas con respecto al agua libre, es decir al agua no perturbada por la proteína. El agua perturbada e involucrada en las interacciones con la proteína es generalmente denominada



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

51.1341

agua de hidratación (Grigera, 1976). Esta última es formada por agua ligada a la proteína, y por agua estructurada, que a pesar de no estar directamente ligada a sitios proteicos tiene sus características estructurales y dinámicas alteradas con respecto al agua libre (Grigera, 1976; Colombo, 1988). El agua ligada puede estar unida a sitios polares, donde la interacción agua-proteína está dominada por interacciones de dipolo eléctrico, o también puede estar superligada por interacciones iónicas con sitios proteicos cargados (Fullerton & col., 1986).

Si por un lado la interacción con el agua favorece la formación de la estructura funcional de la proteína, es decir la conformación nativa, la deshidratación proteica no implica necesariamente la desestructuración. A pesar que es bien conocido que las interacciones agua-proteína estabilizan la conformación macromolecular nativa, una cuestión muy importante es si ver si la deshidratación induce variaciones conformacionales, y si estos cambios son reversibles.

La conformación nativa, es decir aquella con la que la proteína realiza su función, es estabilizada a partir de cierto contenido de agua crítico en la macromolécula (Rupley, Gratton & Careri, 1983). Los primeros trabajos sobre sorción de vapor de agua por films de proteínas muestran que las moléculas proteicas en un film pueden ser consideradas como moléculas aisladas unas de otras (Bull, 1944). Las investigaciones llevadas a cabo con films de proteína muestran que cuando estos son expuestos a altas humedades hay suficiente agua disponible para hidratar la proteína, presentando ésta comportamientos acordes con los observados en solución (Bull, 1944; Grigera, 1972). Asimismo, el estudio del agua de hidratación en films de proteína, desde el punto de vista de la isoterma de sorción de vapor de agua, está correlacionado con los datos experimentales obtenidos por resonancia magnética nuclear (Grigera & Mogilner, 1982).

Estudios realizados sobre hemoglobina muestran que la deshidratación de esta proteína forma derivados óptica (Haurowitz, 1951; Keilin & Hartree, 1952; Maricic & col., 1964; Bohm & Abaturvov, 1977; Alter, 1983) y magnéticamente (Caughey & col., 1966; Papaefthymiou & col., 1975) distintos de los observados en solución. Trabajos efectuados con films hemoglobina (Hb) y mioglobina (Mb) muestran que la deshidratación de estas hemoproteínas estabiliza una nueva conformación, caracterizada por la rigidez estructural ante la ausencia de agua (Colombo, 1988; Colombo & Sanches, 1990). Estos trabajos muestran que los cambios conformacionales producidos durante la deshidratación de la Hb y de la Mb son inducidos por la alteración del contenido de agua en el film.

El estudio de la capacidad de recuperación de la estructura conformacional nativa, luego de la rehidratación previo secado, permite investigar la irreversibilidad del proceso de

deshidratación. Los trabajos realizados determinando el contenido de agua en films de mioglobina equilibrados con diferentes humedades relativas (isotermas de sorción de vapor de agua por Mb), muestran que se producen cambios irreversibles cuando la proteína es deshidratada por debajo de cierto valor crítico (Grigera & Mogilner, 1982; Mogilner, 1989).

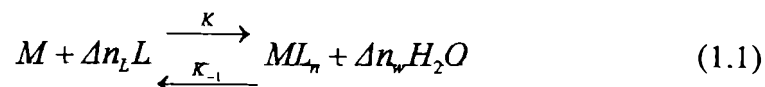
El panorama presentado hasta aquí, sugiere que la combinación en un mismo experimento de una técnica experimental que brinde información sobre la conformación, con otra que determine el contenido de agua en la proteína, permitiría obtener directamente la relación existente entre el contenido de agua y la conformación proteica asociada. De esta forma, la realización de un experimento de este tipo permite un mejor estudio sobre los eventos moleculares producidos durante la deshidratación, y constituye uno de los objetivos de este trabajo.

Existen muchos métodos para estudiar el agua de hidratación en macromoléculas, a modo de citar algunos ejemplos podemos nombrar: resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia dieléctrica, cristalografía por difracción de rayos X, viscosidad, isotermas de sorción de vapor de agua, la simulación biomolecular bajo el protocolo multicopia, que utiliza los datos cristalográficos para obtener una información dinámica del agua de hidratación (Podjarny & col., 1997), etc. Cada uno de estos métodos brinda diferente información sobre la hidratación macromolecular, sin embargo, con estas técnicas por si solas es muy dificultoso estudiar la contribución del agua de hidratación en las reacciones producidas durante la función proteica.

El comportamiento funcional de las proteínas es crucialmente dependiente de la interacción con el agua solvente. La unión de ligantes en las proteínas alostéricas, la asociación de enzimas a substratos, la oligomerización o la desnaturalización, son siempre acompañadas por una reorganización estructural y, en consecuencia, por la captación o liberación de agua de hidratación. De esta manera, el cambio en la energía libre asociado con la mayoría de las reacciones biológicas en solución incluye, además del trabajo para romper viejos y crear nuevos contactos intramoleculares, el trabajo para reorganizar la red de moléculas de agua interactuando con el biopolímero. Esta última contribución pone en evidencia que el cambio neto en la energía libre de la reacción depende de la actividad de agua en la solución, a_w . De la misma forma, cambios en a_w implican un corrimiento en la constante de equilibrio de muchas reacciones bioquímicas.

Los procedimientos termodinámicos clásicos, como los aplicados para determinar la estequiometría y cantidad de ligantes regulares unidos a la macromolécula durante la reacción (Wyman, 1964; Wyman & Gill, 1990), pueden ser extendidos para caracterizar los

cambios en la hidratación macromolecular producidos en la reacción. Tanford fue el primero en considerar cuantitativamente esta posibilidad, extendiendo las ecuaciones de Wyman clásicas mediante la aplicación de la ley de acción de masas pudo incluir los efectos de la hidratación en el equilibrio bioquímico (Tanford, 1969). En este formalismo se reconoce que la unión de un número Δn_L de ligante L a la macromolécula M , produce un cambio en la hidratación, Δn_w , descripto por



luego, el cambio en a_w está necesariamente acoplado con el cambio en la concentración de ligantes libres, o actividad de ligantes a_L , estos cambios producen un corrimiento en la constante de equilibrio K de la reacción representada en la ecuación (1.1), dado por

$$\left. \frac{d \ln K}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \Delta n_w + \Delta n_L \frac{d \ln a_L}{d \ln a_w} \quad (1.2)$$

de esta forma, la ecuación (1.2) muestra que el cambio en el $\ln K$ producido por el cambio del $\ln a_w$ es directamente proporcional al número diferencial de moléculas de agua, Δn_w , ligadas durante la reacción, más una contribución extra dada por el número diferencial de ligantes incorporados a la macromolécula multiplicado por el cambio en el $\ln a_L$ producido por cambios en el $\ln a_w$. El subíndice a_i en la ecuación (1.2) indica que la actividad de cualquier otro ligante distinto de L y H_2O es mantenida constante. Si bien esta formulación considera correctamente los efectos de la solvatación sobre las reacciones bioquímicas, su uso ha sido muchas veces restringido al análisis de reacciones sensibles a altas concentraciones de sal, como la estabilidad conformacional del ADN (Record & col, 1978), y oxigenación de la Hb (Haire & Hedlund, 1977; Colombo, Rau, & Parsegian, 1994). La razón del uso limitado del formalismo de Tanford se debió exclusivamente a motivos experimentales.

En la mayoría de las reacciones biológicas que se producen entre especies de alta afinidad la concentración de ligantes libres en la solución es muy pequeña. De manera que son los cambios en a_w los que producen cada corrimiento detectable sobre el equilibrio. Recientemente, la limitación experimental de la ecuación (1.2) fue vencida exitosamente mediante el uso de solutos neutros, como diferentes azúcares y polioles, para ajustar independientemente la actividad del agua percibida por las moléculas reaccionantes en la solución. El uso de tal aproximación (Colombo, Rau, & Parsegian, 1992) fue inspirado en el antiguo uso de solutos neutros para medir las fuerzas de hidratación involucradas en los

arreglos macromoleculares (Parsegian, Rand, & Rau, 1995), y son justificados por el conocimiento de que algunos solutos neutros son excluidos preferencialmente de la superficie macromolecular (Arakawa & Timasheff, 1985). De esta manera, evitando la interacción directa entre la macromolécula y el soluto mediante interacciones de exclusión mutua, pueden obviarse las interacciones de la macromolécula con otro solvente que no sea el agua. Por lo tanto, estos solutos inertes solo producen el efecto indirecto de cambiar la actividad del agua en la solución. Este panorama experimental presentado sobre los cambios que a_w produce en la reacción representada en la ecuación (1.1), indica que los cambios en la constante de equilibrio K escritos en la ecuación (1.2) pueden ser expresados como

$$\left. \frac{d \ln K}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \Delta n_w \quad (1.3)$$

donde Δn_w es la diferencia de hidratación producida en la macromolécula durante la reacción. El uso de la ecuación (1.3) para analizar el efecto indirecto de los solutos neutros sobre las reacciones bioquímicas es llamado *método de estrés osmótico* (OS) (Parsegian, Rand, & Rau, 1995).

Originalmente, el OS fue usado para medir los cambios en la hidratación producidos por los cambios conformacionales inducidos por la captación de oxígeno en hemoglobina (Colombo, Rau, & Parsegian, 1992). Mediante el análisis de la dependencia de la afinidad del oxígeno de la Hb con la actividad del agua, ajustada usando diferentes solutos neutros, pudo observarse que aproximadamente 70 moléculas de agua se ligan a la Hb durante el proceso completo de oxigenación (Colombo & col., 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996). Esta estequiometría de la unión de agua es independiente del tamaño y de la naturaleza química de los solutos usados para fijar la actividad del agua, como es de esperar si no ocurren interacciones directas entre el soluto y la proteína (Tanford, 1969; Colombo & col., 1992). Por otra parte, estos cambios en la hidratación de la Hb producidos durante la oxigenación, medidos en solución, presentan un muy buen acuerdo con el computo de la diferencia de área superficial accesible al solvente (ASA) entre las estructuras de oxi y desoxi-Hb, determinadas a través de las estructuras cristalográficas (Chothia & col., 1976).

La estrategia del estrés osmótico fue rápidamente adoptada para investigar el rol del agua en muchas reacciones biológicas. Por citar algunos ejemplos, fue aplicado para estudiar los efectos de la hidratación sobre la catálisis enzimática (Rand & col., 1993), estabilidad del ADN (Preisler & col., 1995), interacción del ADN con biomoléculas (Brown & col., 1999;

Ruggiero Neto & Colombo, 2000), estabilidad y plegamiento de proteínas (Plaza del Pino & Sanchez-Ruiz, 1995; Kamiyama & col, 1999), comportamiento alostérico de la Hb dimérica (Royer Jr. & col., 1996), en la formación de proteínas y transiciones de estado del ADN (Sidorova & Rau, 2000), etc. En algunos de estos estudios se muestra un acuerdo entre los cambios de hidratación determinados en solución y los inferidos por información cristalográfica.

A pesar de que estos estudios contribuyeron a reforzar la idea de que el efecto de los solutos neutros en la reacción puede ser racionalizado en términos de la cantidad de agua ligada, algunos autores no comparten esta interpretación. Los argumentos presentados a favor de las interpretaciones alternativas del efecto del soluto sobre la estabilidad y reactividad de la proteína, están basados en el concepto de los parámetros de interacción preferencial (Timasheff, 1998), o en el concepto del efecto del volumen excluido causado por empaquetamiento de solutos en torno a la macromolécula (Davis-Searles & col., 1998). El foco de estas formulaciones es que los solutos no pueden ser considerados inertes y excluidos de la superficie macromolecular. Recientemente han sido presentados argumentos mostrando que los tres puntos de vista diferentes sobre el efecto del soluto en las reacciones bioquímicas, llámense estrés osmótico, interacciones preferenciales, y empaquetamiento, pueden compartir una perspectiva común (Parsegian & col., 2000).

Dado el popular uso del estrés osmótico como única estrategia para analizar la contribución de la hidratación en las reacciones biológicas, y dado que este método a sido sujeto a severas críticas, es de gran importancia la realización de un experimento alternativo que permite una medición experimental directa de la cantidad de agua ligada durante el transcurso de una reacción bioquímica. El desarrollo de un método alternativo, que permite contrastar medidas experimentales obtenidas con el OS e investigar nuevas propiedades, constituye otro objetivo de este trabajo.

La técnica experimental desarrollada en el presente trabajo, resulta de combinar en un mismo experimento la espectrofotometría en el rango visible, que determina la conformación de las macromoléculas estudiadas, con el método de la *microbalanza de cuarzo* (Kennerley, 1969) para medir el contenido de agua en films de proteínas. El experimento que resulta de esta combinación permite obtener en forma simultánea la cantidad de agua ligada y la conformación macromolecular en films de proteínas expuestos a humedades relativas controladas, y determinar *in situ* la cantidad de agua incorporada durante una reacción macromolecular.

Con esta técnica experimental, encaramos el estudio de la hemoglobina, una de las proteínas más populares e investigadas. Esta proteína constituye un prototipo para estudiar la relación estructura-función en muchas biomacromoléculas. En este trabajo, estudiamos el rol del agua en la estructura y función de la hemoglobina y mioglobina, proteínas cuyas características serán descriptas a continuación.

1.1) Hemoglobina y mioglobina

La transición de la forma de vida anaeróbica a la aeróbica fue una etapa trascendental en la evolución pues descubrió una rica fuente de energía. Se extrae 18 veces más energía de la glucosa en presencia de O_2 que en su ausencia (Stryer, 1988). En los vertebrados han evolucionado dos mecanismos principales para promover a sus células de un flujo continuo y adecuado de oxígeno. El primero es un mecanismo circulatorio que suministra O_2 activamente a las células. La segunda adaptación importante es la adquisición de moléculas transportadoras de O_2 para contrarrestar la limitación impuesta por la baja solubilidad de este en el agua. Los transportadores y acumuladores de oxígeno en los vertebrados son respectivamente las proteínas hemoglobina (Hb) y mioglobina (Mb).

La Hb es una proteína globular transportadora de oxígeno que está presente en los glóbulos rojos o eritrocitos de la sangre de los vertebrados. Su principal función biológica es transportar O_2 de los pulmones a los tejidos, y contribuir con el transporte de dióxido de carbono en sentido inverso. La Mb, localizada en el músculo, sirve como reserva de O_2 y facilita el desplazamiento del mismo en los músculos.

1.1.1) *Estructura*

Las primeras grandes estructuras macromoleculares en ser estudiadas cristalográficamente por difracción de rayos X fueron la Mb (Kendrew, 1961; 1963) y la Hb (Perutz, 1964). Estos estudios popularizaron aún más estas hemoproteínas y demostraron que la cristalografía por rayos X puede revelar la estructura de moléculas tan grandes como las proteínas. La mayor estructura resuelta antes de 1957 fue la de la vitamina B_{12} , que posee una masa molecular un orden de magnitud menor que la Mb y la Hb.

La estructura de la Hb es aproximadamente esférica, con un diámetro de 64 Å, y una masa molecular de aproximadamente $64500 \text{ gr mol}^{-1}$. La estructura, representada en la Figura 1.1, consiste en un tetrámero formado por cuatro subunidades similares. Cada una de

las subunidades consiste en una cadena polipeptídica ligada a un grupo prostético llamado grupo hemo, que es un anillo de protoporfirina IX, cuyo centro es un ion ferroso al cual el oxígeno molecular se liga reversiblemente, lo que posibilita el transporte máximo de cuatro moléculas de O_2 por molécula de Hb.

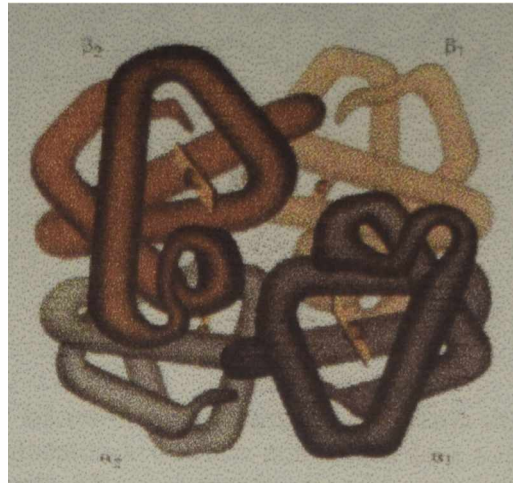


Figura 1.1 : Representación de las estructuras terciaria y cuaternaria de la hemoglobina humana (Hb A₁) (Garrett & Grishlam, 1995). Esta proteína está formada por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas α con 141 residuos de aminoácidos, y dos cadenas β con 146 residuos de aminoácidos cada una. Cada cadena polipeptídica posee un grupo prostético hemo, al cual se une el O_2 . Las 4 subunidades están conectadas por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, y enlaces salinos.

En los humanos adultos existen dos fracciones de hemoglobina: la Hb A₁, que representa aproximadamente el 98 % del total de hemoglobina; y la Hb A₂, que representa alrededor del 2 % del total (Stryer, 1988). En la Hb A₁, la porción proteica llamada globina está constituida por dos cadenas α conteniendo cada una 141 residuos de aminoácidos, y por dos cadenas β de 146 residuos cada una (Voet & Voet, 1995).

La Mb, representada en la Figura 1.2, es otra hemoproteína aproximadamente esférica, con un diámetro de unos 30 Å. En los vertebrados posee una masa molecular de alrededor de $17000 \text{ gr mol}^{-1}$. Las estructuras tridimensionales de la Mb y de cada una de las subunidades de la Hb son sorprendentemente similares a pesar de la existencia de una gran diferencia en la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de la Mb y de las cadenas α y β de la Hb solo coinciden en unas pocas posiciones. Los aminoácidos que permanecen invariantes están involucrados fundamentalmente en las curvaturas de la cadena polipeptídica y en la interacción con el grupo hemo.

La capacidad de la Hb y de la Mb para unirse al oxígeno depende de la presencia del grupo hemo, el cual confiere a estas proteínas su color característico. A una hemoproteína sin su grupo prostético característico se la denomina apoproteína.

corresponde a los grupos carboxilos, próxima a la superficie macromolecular, el resto se encuentra en el interior de la macromolécula, donde está rodeado por residuos hidrofóbicos excepto dos histidinas (Perutz, 1976). El átomo de hierro se encuentra ubicado a unos 0,3 Å fuera del plano de la porfirina, en el lado de la histidina F8. De las seis posiciones de coordinación del hierro, cinco se encuentran siempre ocupadas: cuatro de ellas por los nitrógenos de la porfirina, mientras que la quinta posición es ocupada por el nitrógeno de la histidina F8, llamada histidina proximal. El centro del enlace para el O₂ se encuentra al otro lado del plano del hemo, en la sexta posición de coordinación del hierro. En los estados oxidados meta-Hb y meta-Mb, este centro de enlace está ocupado por agua (Perutz, 1970; 1976). En este lado del plano determinado por el hemo, donde se encuentra la sexta posición de coordinación, existe un segundo residuo de histidina, próximo al hemo pero no ligado a él, es la histidina distal E7.

El grupo hemo es el cromóforo responsable de la absorción de luz visible por la proteína. Las principales causas del cambio en el espectro de absorción óptica de estas hemoproteínas son: el cambio del ligante coordinado al hierro, el cambio en el estado de oxidación de este ion (Eaton & Hofrichter, 1981), y algunas veces, cambios estructurales de la globina (Perutz & col., 1974). Por lo tanto, el análisis de los espectros de absorción óptica en el rango visible de la Hb y de la Mb brinda información sobre el estado de ocupación de la sexta posición de coordinación del hierro, sobre la oxidación, y sobre la conformación de estas proteínas.

Las primeras investigaciones sobre deshidratación de hemoglobina realizadas mediante espectroscopia de absorción óptica, muestran que la proteína deshidratada presenta un espectro distinto del obtenido en solución. Por las características espectrales de estos complejos formados por deshidratación, se propuso que la sexta posición de coordinación del hierro debería estar ocupada por un grupo nitrogenado endógeno a la proteína (Haurowitz, 1951; Keilin & Hartree, 1952). Años después, con la resolución de la estructura de la Mb por análisis de difracción de rayos X, pudo observarse que el grupo nitrogenado de la cadena polipeptídica más accesible para unirse al hierro era la histidina distal E7 (Kendrew, 1963). Por lo tanto, el complejo formado por la deshidratación de la Hb es un complejo en el cual el hierro se encuentra coordinado a dos histidinas, la proximal y la distal. La designación dada a este derivado fue la de hemocromo o hemicromo, dependiendo de que el estado de oxidación del hierro fuese ferroso (+2) o férrico (+3) respectivamente. Estos estados derivados son estabilizados por la deshidratación proteica (Colombo, 1988, Colombo & Sanches, 1990).

Teniendo en cuenta que la deshidratación de la Hb produce cambios conformacionales comparados con las conformaciones presentes en el estado hidratado, tomamos este sistema como objeto de nuestros estudios referidos al agua involucrada en la estructura proteica. A través del estudio del equilibrio conformacional en función de la hidratación, investigamos los cambios estructurales inducidos por el contenido de agua en la proteína y el problema de la estabilidad de estas conformaciones, como así también la irreversibilidad del proceso de deshidratación. Mediante el estudio cinético buscamos informaciones complementarias sobre la dependencia de la flexibilidad estructural con el agua de hidratación, y la existencia o no de estados conformacionales intermedios durante la deshidratación.

1.1.2) Función

La captación de O_2 por parte de la Hb y de la Mb ha sido estudiada determinando experimentalmente las curvas de unión del oxígeno. Estas curvas, mostradas en la Figura 1.3, consisten en la representación gráfica de la fracción de saturación de la proteína con el O_2 , Y , en función de la presión parcial del oxígeno en la solución, pO_2 .

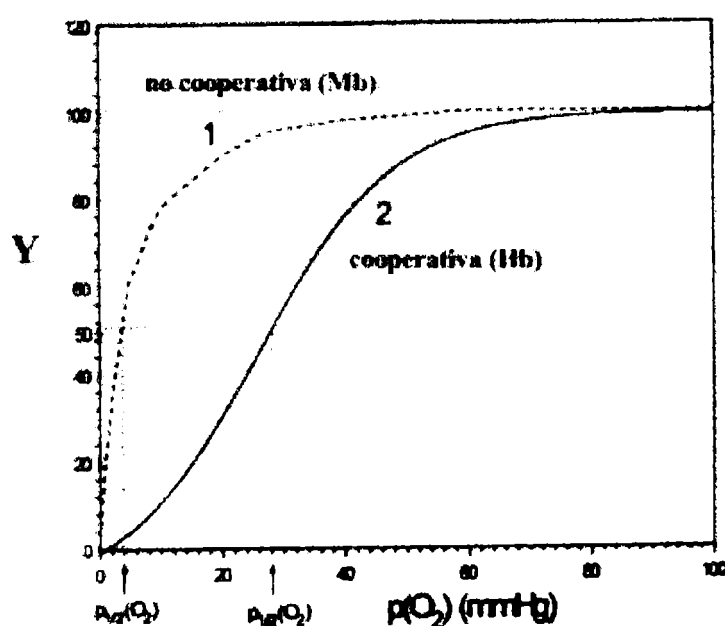


Figura 1.3: Curvas de asociación con el oxígeno, para la Mb (1) y la Hb (2), en función de la presión parcial de O_2 en la solución.

Las curvas de unión del O_2 de la Mb y de la Hb difieren en dos aspectos. El primero es que la Mb posee una mayor afinidad por el oxígeno que la Hb. La afinidad por el O_2 puede caracterizarse a través del parámetro $p_{1/2}$, que es el valor de la presión parcial de

oxígeno a la cual se encuentran ocupados el 50 % de los sitios de unión, es decir, que corresponde a $Y = 0,5$. Para la Mb, $p_{1/2} = 4$ mm Hg; mientras que para la Hb, $p_{1/2} = 28$ mm Hg. La segunda diferencia es que la curva de unión del O_2 por la Mb es hiperbólica, mientras que la curva de la Hb es sigmoidea. La forma sigmoidea de la curva de la Hb es la más adecuada a su función transportadora de O_2 en la sangre: desde los pulmones, donde la presión de O_2 es alta (100 mm Hg), a los tejidos, donde la presión de O_2 es baja (20 mm Hg). En términos moleculares, la forma sigmoidea significa que la unión del O_2 a la Hb es cooperativa, es decir que la unión del O_2 a un grupo hemo facilita la unión del O_2 a los otros tres grupos hemo.

Durante el transcurso de su función transportadora de O_2 la Hb presenta dos conformaciones muy diferenciadas: una conformación relajada R que corresponde a la proteína totalmente oxigenada, llamada oxi-Hb; y otra conformación tensa T donde la proteína está completamente desoxigenada, llamada desoxi-Hb (Forbes & Roughton, 1931). Estas conformaciones presentan espectros ópticos característicos en el rango visible, como muestra la Figura 1.4.

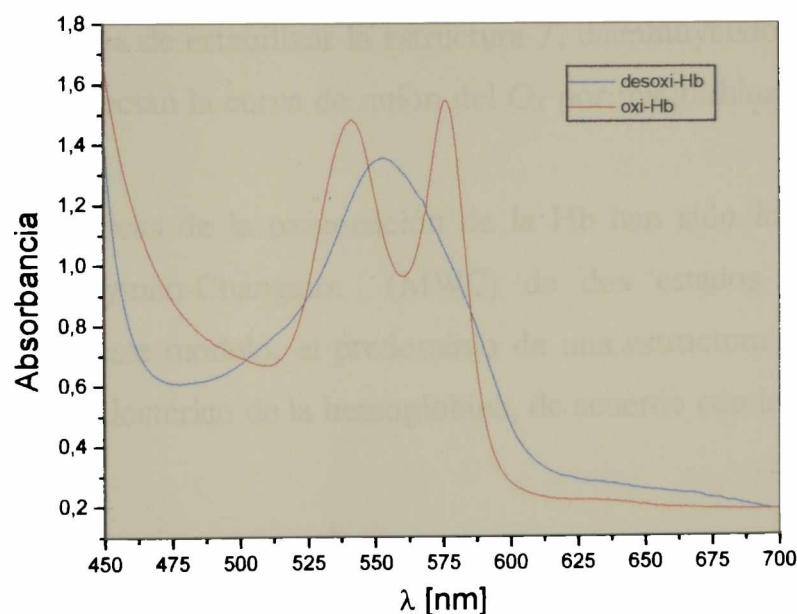
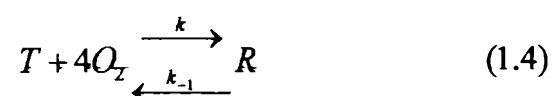


Figura 1.4 : Espectros ópticos en el rango 450-700 nm para una solución 15 μ M Hb + 10 mM tampón Hepes + 100 mM NaCl, pH 7, preparada a partir de la oxi-hemoglobina purificada mediante el procedimiento descrito en la sección 2.1.1. La forma desoxi es obtenida equilibrando la solución con una atmósfera de N_2 . El espectro que presenta dos picos de absorbancia en 540 y 576 nm caracteriza al estado oxi-Hb, mientras que el espectro con pico de absorbancia en 555 nm caracteriza al estado desoxi-Hb. La mioglobina presenta espectros de absorción visible muy semejantes a los de la Hb; en la Mb, la forma oxi presenta dos picos de absorbancia en 544 y 582 nm, en tanto que la forma desoxi tiene un pico en 551 nm (Bowen, 1949).

La capacidad de la Hb para unirse al O_2 está regulada por interacciones alostéricas que se definen como interacciones entre centros espacialmente distintos y que son transmitidos como cambios conformacionales en la proteína (Monod, Wyman, & Changeux, 1965). La Hb es el prototipo para el estudio de las enzimas alostéricas. Esta proteína posee muchos activadores alostéricos, los que modulan su afinidad por el O_2 . Un activador alostérico puede ser homo o heterotrópico. Un activador alostérico es considerado homotrópico cuando la unión de un ligante X interfiere en la unión de otra molécula de X a otro sitio proteico, como en el caso de la unión del O_2 a la Hb. Mientras que cuando la unión de un ligante Y interfiere en la unión de otro ligante Z , el activador es considerado heterotrópico.

La integración funcional de la hemoglobina a las necesidades fisiológicas es realizada a través de la unión de activadores alostéricos heterotrópicos (Cl^- , fosfatos orgánicos, H^+ , CO_2), los cuales modulan el equilibrio entre las formas T y R , y por lo tanto, la afinidad por el oxígeno (Benesh & col., 1969). La curva de unión del oxígeno por hemoglobina, mostrada en la Figura 1.3, se ve afectada por la presencia de estos activadores alostéricos. En la Hb, la mayoría de los activadores heterotrópicos se unen a la forma desoxigenada, de manera de estabilizar la estructura T , disminuyendo la afinidad por el O_2 . Estos activadores no afectan la curva de unión del O_2 por mioglobina puesto que esta no es una proteína alostérica.

Las características de la oxigenación de la Hb han sido interpretadas dentro del modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC) de dos estados (Monod, Wyman, & Changeux, 1965). En este modelo, el predominio de una estructura con relación a otra se refleja en el equilibrio alostérico de la hemoglobina, de acuerdo con la reacción representada por



de modo que una mayor población de hemoglobina en la conformación R desplaza el equilibrio para el lado derecho, o sea, facilita la unión del oxígeno a la Hb. Por otro lado, una mayor población de Hb en la conformación T desplaza el equilibrio para el lado izquierdo de la reacción, es decir, la afinidad de la proteína por el O_2 es disminuida. Los activadores heterotrópicos de la Hb, en su mayoría, se unen a la conformación *desoxi* de manera de estabilizarla. De esta forma, el predominio de la estructura T en relación a la estructura R , causa una disminución de la afinidad de la Hb por el O_2 . A modo de ejemplo,

en las hemoglobinas de mamíferos la afinidad por el O_2 es disminuida significativamente por la unión de aniones, principalmente fosfatos orgánicos como 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), y secundariamente por el ion Cl^- .

La unión del O_2 induce cambios en las estructuras terciarias y cuaternarias de la Hb. La caracterización molecular detallada de estos cambios conformacionales fue realizada comparando las estructuras cristalográficas en los dos estados finales de la oxigenación: el desoxi y el oxi (Perutz, 1970; Baldwin & Cothia, 1979). Estos estudios muestran que la estructura *T* está contraída a causa de ocho enlaces salinos que se establecen entre subunidades diferentes, mientras que la forma *R* carece de estos enlaces salinos y posee una mayor afinidad por el O_2 . En la oxigenación, el átomo de hierro se desplaza hacia el plano del hemo arrastrando la histidina proximal con él. Este desplazamiento rompe algunos enlaces salinos y desplaza el equilibrio de la forma *T* a la forma *R*. La cuarta molécula de O_2 se une más fácilmente que la primera puesto que quedan menos enlaces salinos por romper.

Históricamente, el descubrimiento de que la estructura de la desoxi-Hb difiere sustancialmente de la oxi-Hb otorgó un gran respaldo al modelo alostérico de dos estados propuesto por Monod-Wyman-Changeux en 1965. Este descubrimiento propició además una descripción molecular del efecto de ligantes heterotrópicos sobre la afinidad de la Hb por el O_2 . Sin embargo, estudios funcionales posteriores han demostrado la existencia de intermediarios energéticos en el proceso de oxigenación de la Hb (Ackers & col., 1992; Bucci & col., 1998), hecho incompatible con el modelo MWC. Asimismo, trabajos realizados con Hb en presencia y en ausencia de NaCl muestran que la conformación desoxi de la proteína ligada a aniones Cl^- difiere de la conformación desoxi libre de estos aniones (Colombo & Seixas, 1999; Seixas, de Azevedo, & Colombo, 1999). Estas y otras evidencias obtenidas en otros experimentos sugieren la existencia de estados conformacionales intermedios durante el proceso de oxigenación, de manera que el control funcional de la Hb ocurre a través de un camino estructural más complejo que el propuesto por el modelo MWC de dos estados. La caracterización estructural de los eventuales estados intermedios entre los estados canónicos *T* y *R* aún no ha sido estudiada completamente.

Los estudios estructurales y funcionales realizados sobre hemoglobina revelan que, a excepción del ion Cl^- , los otros activadores alostéricos heterotrópicos se unen a sitios específicos de la proteína. El DPG se une a grupos cargados positivamente de las dos cadenas β situados en la cavidad central de la desoxi-Hb, estabilizando la estructura desoxi y disminuyendo su afinidad por el O_2 . El CO_2 se liga a los grupos amínicos terminales de las cuatro cadenas formando enlaces carbamato fácilmente reversibles. Los iones H^+ ,

involucrados en el efecto del pH sobre las curvas de oxigenación (efecto Bohr), se ligan a tres pares de centros: los entornos de un par de grupos amínicos terminales y dos pares de cadenas laterales de histidina se cargan más negativamente en la desoxi-Hb, por lo cual se unen al H^+ cuando se libera O_2 . Por otra parte, el Cl^- se une a la Hb a través de interacciones electrostáticas no específicas (Perutz & col., 1993; 1994). La acción del Cl^- consiste en neutralizar, a través de condensación iónica, el exceso de cargas positivas presentes en la cavidad central de la Hb, en una región entre las cadenas α y β . Este exceso de cargas positivas promueve una repulsión electrostática desestabilizando la estructura T , desplazando el equilibrio conformacional para la estructura R de alta afinidad por el O_2 . La función del ion Cl^- es entonces la de producir un blindaje de estas cargas positivas de la cavidad central, disminuyendo la fuerza de repulsión electrostática entre los residuos, desplazando el equilibrio para el estado T de baja afinidad por el O_2 .

Los cambios conformacionales producidos por la oxigenación de la Hb, representados esquemáticamente en la Figura 1.5, implican que las formas desoxi y oxi presentan diferentes áreas superficiales expuestas al solvente (Chothia & col., 1976).

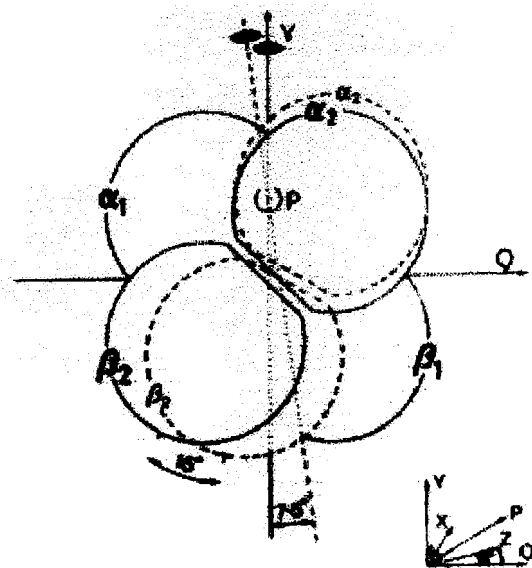


Figura 1.5 : Diagrama esquemático representando el cambio en la estructura cuaternaria de la forma desoxi-Hb (—) respecto de la forma oxi-Hb (----). Estas diferencias conformacionales se deben fundamentalmente a cambios en las orientaciones relativas del dímero $\alpha_1\beta_1$ respecto del dímero $\alpha_2\beta_2$. Un par de subunidades $\alpha\beta$ cambia respecto al otro par por medio de una rotación de 15° y una traslación de $0,8 \text{ \AA}$ (Perutz & col., 1998).

Durante la transición $T \rightarrow R$ varios contactos entre grupos de las subunidades proteicas son quebrados y expuestos al solvente. Esta diferencia estructural es acompañada por el aumento de la superficie proteica en contacto con el solvente, aumentando el número de moléculas de agua ligadas a la proteína en la forma R (Colombo & col., 1992).

Estudios realizados mediante el *método de estrés osmótico* muestran que la afinidad de la Hb por el O₂ disminuye cuando la actividad de agua en la solución es disminuida, y que aproximadamente 70 moléculas de agua se incorporan a la Hb en el transcurso de la transición $T \rightarrow R$ (Colombo & col., 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996). Estos estudios permiten observar que el agua es fuertemente involucrada en la energética de la reacción, actuando como un activador alostérico heterotrópico incorporado durante la oxigenación de la Hb.

En el presente trabajo investigamos, además del agua involucrada en la estructura, el rol del agua en la función proteica. De esta forma, mediante mediciones *in situ*, determinamos la cantidad de agua ligada durante la oxigenación de films de Hb en equilibrio con una atmósfera de 98 % de humedad relativa. A través de los estudios cinéticos de la transición de la forma desoxi para la forma oxi, investigamos la relación entre la captación de oxígeno y el contenido de agua. Asimismo, investigamos el efecto del Cl⁻ en la oxigenación y en la estabilización de nuevas estructuras.

2- Materiales y métodos

2.1) Muestras

2.1.1) *Purificación de hemoglobina*

La hemoglobina en la forma oxi (oxi-Hb) es obtenida a partir de la sangre extraída de un humano adulto sano y no fumador, que no haya ingerido bebidas alcohólicas en las últimas 24 horas anteriores a la extracción. La extracción es por punción venosa con jeringas, hasta completar 40 ml. Conseguido este volumen de sangre, le adicionamos una cantidad muy pequeña de tampón anticoagulante heparina de sodio a pH 7.

Todos los procesos siguientes son realizados a 4 °C.

El primer paso a realizar es el retirado del plasma sanguíneo. Para retirar el plasma, la sangre colocada en un tubo es centrifugada a 900 g ($g=9,8 \text{ m/s}^2$) durante 3 minutos. Luego de la centrifugación, el plasma a retirar, de color rojo claro, queda alojado en la fase superior; mientras que la hemoglobina a purificar, de color rojo oscuro, se encuentra en la fase inferior del tubo, contenida en los eritrocitos.

Una vez retirado el plasma, agregamos un volumen del tampón salino Tris-HCl 50 mM + NaCl 0,9 % + EDTA (ácido etilendinitrilo tetra acético, sal disódico) 1 mM, pH 8,5, en una cantidad aproximadamente igual al volumen de los eritrocitos precipitados. Mezclamos y centrifugamos nuevamente a 900 g durante 3 minutos para luego retirar mas plasma y otros residuos como pequeños coágulos. Este procedimiento de lavado se repite 4 veces, de manera de optimizar la pureza de la muestra en contenido de eritrocitos.

Luego del lavado de los eritrocitos se realiza la hemólisis, que consiste en la ruptura de las membranas de los eritrocitos mediante la adición de una pequeña cantidad de la solución hipotónica Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM, pH 8,5.

Para separar las fases de residuos de membranas y de hemoglobina, adicionamos cloroformo puro (MERK) en un volumen igual al de la solución de la muestra, agitando constantemente. Los residuos de membranas y el cloroformo interactúan hidrofóbicamente, quedando confinados en la fase inferior del tubo. Almacenamos una muy pequeña cantidad de la fase superior, consistente en hemoglobina y algunas otras enzimas, para realizar electroforesis y comparar con el producto obtenido luego de finalizada la purificación. El resto de la fase superior es separada y sometida a centrifugación a 2500 g durante 2 horas, con el objeto de separar aún mas la fase de residuos.

Acabada la centrifugación, la fase superior consistente en hemoglobina y una pequeña cantidad de otras enzimas, es retirada y filtrada en filtro Millipore de diámetro de poro 1,2 μ m, para luego ser colocada en el interior de una tripa de diálisis, previamente hervida durante 20 minutos, y realizar una diálisis contra tampón Tris-HCl. 15 mM + EDTA 1 mM, pH 8,5, en un volumen de 4 litros durante no menos de 12 horas, con el fin de llevar la muestra a un pH de 8,5.

Una vez que todas estas etapas han sido realizadas, aplicamos la muestra a la columna de cromatografía para separar las distintas fracciones proteicas.

Para el montado previo de la columna de cromatografía se utilizan 2 gramos de resina aniónica DEAE-SEPHADEX A-50 (Pharmacia), los que son adicionados a aproximadamente 300 ml de tampón Tris-HCl 15 mM, pH 8,4. La resina se deja hidratar completamente durante 12 horas, a temperatura del laboratorio (22 °C). Pasado este tiempo, la resina hidratada es colocada en una columna XK-50 (Pharmacia), de 2,2 cm de diámetro y 60 cm de altura. Se deja salir por el extremo inferior el sobrante de tampón y se revuelve la resina en la columna hasta lograr la homogeneización, cuidando que no queden burbujas de aire en el interior. Homogeneizada la columna, colocamos un papel de filtro sobre la superficie de la resina, quedando un pequeño excedente de tampón sobre el papel; de esta manera evitamos que al gotear líquido se produzca desorden en la parte superior de la columna.

Seguidamente, en una cámara fría a 4 °C, se instala el sistema de goteo con el tampón Tris-HCl 15 mM pH 8,4 hasta equilibrar la columna, esto es hasta que el pH de la solución saliente sea igual al pH de la solución entrante. El equilibrio se logra pasando un volumen de tampón de aproximadamente 3 veces el volumen de la columna.

Logrado el equilibrio de la columna, aplicamos mediante el sistema de goteo la muestra de hemoglobina dializada. Luego volvemos a gotear con el tampón Tris-HCl 15 mM pH 8,4 durante 12 horas. En este periodo de tiempo deben pasar aproximadamente 700 ml, que corresponde a poco más del doble del volumen de la resina. La muestra, de un color rojo, queda confinada en una franja en la región central de la columna. En el actual pH de 8,4 la hemoglobina posee una carga efectiva negativa, siendo así retenida por los cationes de la resina.

Pasado este tiempo, la columna es acoplada a un sistema FPLC modelo LKB (Pharmacia), que con un flujo de 3 ml por minuto forma un gradiente de pH mezclando fracciones de tampones Tris-HCl 15 mM pH 8,4 y Bis-Tris-HCl 15 mM pH 7 + 1 ml NaCl 2 M. El NaCl es para evitar que la resina en la columna se hinche al bajar el pH. El gradiente es iniciado con volúmenes iguales de ambos tampones, fluyendo el tampón de pH 7 hacia el de pH mas alto. Para que el gradiente llegue al 100 % de tampón a pH 7 es necesario pasar 300 ml del mismo.

A medida que va bajando el pH de la columna, se van desprendiendo las distintas fracciones proteicas según los valores de sus puntos isoeléctricos. Primero sale una pequeña fracción que consiste fundamentalmente en meta-reductasas y catalasas, luego salen las fracciones de hemoglobina.

La primera fracción de Hb obtenida es la A₂. Cuando el gradiente de pH llega al 75 % de tampón a pH 7, la resina posee un pH próximo a 7,9, que corresponde al punto isoeléctrico de la fracción Hb A₂ a 4 °C. En este punto el gradiente es mantenido constante hasta obtener totalmente la fracción Hb A₂ que no representa mas del 2 % del total de la muestra.

La fracción Hb A₁ es obtenida con un gradiente de 100 % de tampón a pH 7. Esta fracción es concentrada mediante centrifugación con concentradores AMICON hasta llegar a un volumen aproximado de 50 ml, para luego ser pasada a través de una columna de intercambio iónico mixto Amberlite MB-1 SIGMA. La muestra es pasada por esta columna al menos 5 veces. La columna contiene 20 ml de resina perfectamente compactada, y tiene como función la desionización de la muestra.

Luego de la desionización, la fracción Hb A₁ libre de iones pasa a llamarse, por convención, Hb A₀.

Al finalizar todos estos procedimientos, se chequea la pureza de la muestra a través de una electroforesis no desnaturizante, con visualización por impregnación del gel en nitrato de plata (Laemmli, 1970).

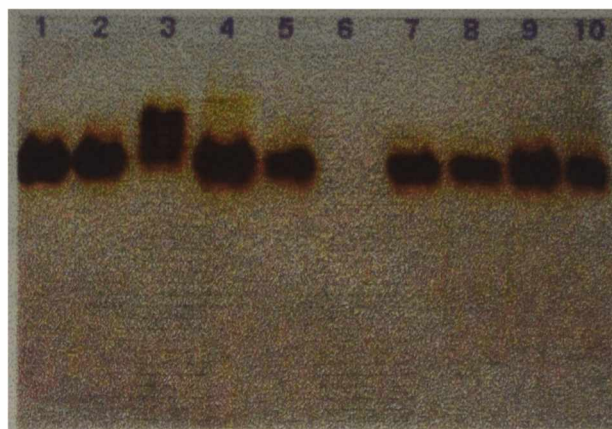


Figura 2.1 : Electroforesis en gel no desnaturizante de poli-acrilamida a 7 %, pH 9,6. Coloreado por impregnación de AgNO_3 . Las bandas en las posiciones 1, 2, 5, 7, 8, 9, y 10 representan la fracción de Hb A_0 luego de la purificación (se observa la presencia de apenas una fracción). La banda en la posición 3 representa la fracción de Hb A_2 separada por cromatografía de intercambio iónico en resina DEAE-SEPHADEX A-50 con gradiente de pH (puede notarse la presencia de dos fracciones). La banda en la posición 4 representa la fracción de Hb antes de la purificación (se observa la presencia de tres fracciones).

Confirmada la pureza de la muestra, es chequeado espectrofotométricamente el contenido de meta-Hb, siendo este inferior al 2 %.

La muestra de Hb A_0 obtenida en la forma oxi (puede ser llevada a la forma desoxi si es expuesta a una atmósfera de N_2) es concentrada por centrifugación con concentradores AMICON hasta aproximadamente 7 mM Hb, y almacenada en alícuotas de 250 μl en N_2 líquido. Esta constituye nuestra muestra de hemoglobina en ausencia de sal, o muestra isoiónica.

La muestra de hemoglobina en presencia de sal, o muestra iónica, consiste en una solución de 1,48 mM Hb A_0 + 200 mM NaCl + 10mM Hepes (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido etanosulfónico]), pH 7, centrifugada a 4000 revoluciones por minuto (r.p.m.) en concentradores AMICON, para ser concentrada hasta aproximadamente 7 mM Hb.

2.1.2) Obtención de meta-hemoglobina

La meta-hemoglobina (meta-Hb) es obtenida por la oxidación de la solución 1,48 mM oxi-Hb A_0 + 200 mM NaCl + 10 mM Hepes pH 7, con un pequeño exceso de ferricianeto de potasio. La oxidación de la Hb con este agente ocurre esencialmente en el hierro, siendo despreciables las reacciones en otros sitios de la proteína (Brunori & col., 1967). La reacción ocurre entre una molécula de ferricianeto y una de oxi-Hb, dando como resultado ferrocianeto y meta-Hb.

Una vez colocada una pequeña cantidad del agente oxidante a la solución de oxi-Hb, esta es agitada levemente y colocada en la heladera a 4 °C durante 30 minutos.

Completada la oxidación, la muestra presenta un color más oscuro, característico de la meta-Hb. Luego, el ferrocianeto formado durante la reacción es retirado de la solución de meta-Hb pasando esta por una pequeña columna (12 cm de altura y 1,25 cm de diámetro) de SEPHADEX-G25 compactada por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 minutos según metodología descrita por Neal & Florini (Neal & Florini, 1973).

La muestra es luego concentrada hasta aproximadamente 7 mM meta-Hb.

2.1.3) Preparación de meta-mioglobina

La meta-mioglobina obtenida del músculo esquelético de Cachalote, liofilizada y libre de sales, es provista por SIGMA. Esta es disuelta en agua destilada y desionizada, en una concentración aproximada de 5 mM, y centrifugada a 15000 r.p.m. durante 30 minutos en centrifugadora SORVALL RC5C a 4 °C, de manera de retirar el material no soluble.

2.1.4) Reducción de meta-mioglobina

La mioglobina en la forma desoxi (desoxi-Mb) es obtenida por reducción de meta-Mb con ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), en ambiente de N_2 . El ditionito es un fuerte agente reductor, capaz de reaccionar muy rápidamente con el O_2 disuelto. Incluso en la fase sólida, el ditionito reacciona con el oxígeno, oxidándose y produciendo sulfito o tiosulfato, que disminuyen su grado de pureza. Aún en condiciones anaeróbicas el ditionito es muy inestable en pH debajo de 7,6 (Dixon, 1971).

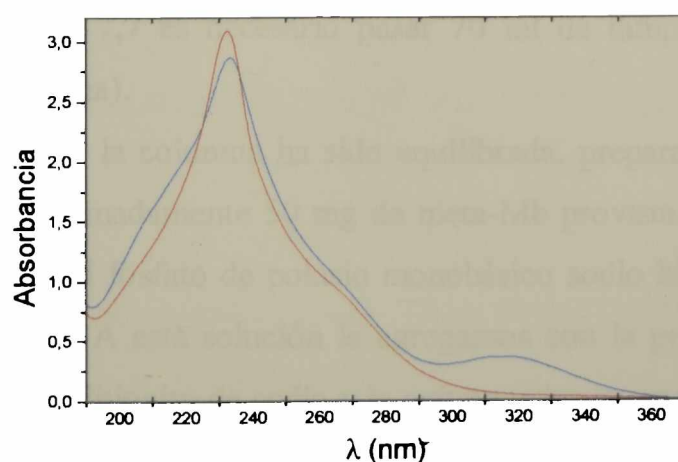


Figura 2.2 : Espectros ópticos en la región 190-370 nm obtenidos en nuestro laboratorio para una solución anaeróbicamente preparada (---) de ditionito de sodio en tampón 10mM fosfato de potasio monobásico sodio hidróxido pH 7,7; y luego de exponer la misma solución a una atmósfera de aire (----).

Como puede verse en la Figura 2.2, el ditionito de sodio presenta un pico de absorción en la longitud de onda de 314 nm, con un coeficiente de Extinción de $8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ljones & Burris, 1972). Esta banda de absorción desaparece completamente luego de la aireación.

La reducción de meta-Mb con ditionito de sodio es realizada completamente en una campana rectangular de un volumen de aproximadamente 1 m^3 , en la que el aire es reemplazado totalmente por N_2 previamente circulado por agua destilada, de manera de tener un ambiente anaeróbico húmedo. La campana tiene incorporado un par de guantes de goma especiales para manipular elementos en su interior, y también posee una trampa que permite retirar e incorporar material manteniendo la atmósfera de nitrógeno.

Todos los procesos siguientes son realizados en el interior de la campana, o en ambiente anaeróbico, a temperatura de 22°C . Los productos de la reacción del ditionito con el O_2 son muy deteriorantes para la proteína, siendo necesario tener extremo cuidado en evitar la presencia de contenidos residuales de oxígeno en los elementos.

Primeramente montamos la columna de separación por tamaño de partículas, que nos permitirá remover el ditionito de la solución de Mb, luego que la reducción haya sido realizada. Para el montado de la columna, dejamos hidratar durante no menos de 12 horas 1 gramo de resina SEPHADEX G-25 (ICN Biomedicals Inc.) en 120 ml de tampón 10 mM fosfato de potasio monobásico sodio hidróxido pH 7,7, previamente burbujeado con N_2 en el interior de la campana. Pasado este tiempo, la resina hidratada es colocada en el interior de la columna (Pharmacia), la que posee un diámetro de 1,2 cm y una altura de 15 cm. La columna es equilibrada goteando el tampón 10 mM fosfato de potasio monobásico sodio hidróxido, pH 7,7. Para que el pH de la solución saliente por el extremo inferior de la columna sea igual a 7,7 es necesario pasar 70 ml de tampón (poco mas de 3 veces el volumen de la columna).

Una vez que la columna ha sido equilibrada, preparamos una solución anaeróbica consistente en aproximadamente 50 mg de meta-Mb provista por SIGMA disueltos en 0,5 ml de tampón 10 mM fosfato de potasio monobásico sodio hidróxido pH 7,7; y retirado el material no soluble. A esta solución le agregamos con la punta de una espátula fina una pequeña cantidad de ditionito de sodio y la agitamos levemente hasta observar un cambio en el color de la muestra, desde el oscuro característico de la meta-Mb al rojo-rosa característico de la desoxi-Mb.

Inmediatamente completada la reacción, el ditionito es removido de la muestra aplicando esta a la superficie de la columna previamente montada, mediante una jeringa

especial. Seguidamente continuamos aplicando el goteo con el tampón de pH 7,7 haciendo que la muestra, concentrada en una franja, comience a descender. Primero descienden las partículas más grandes, luego las más pequeñas. De esta manera, una vez que la muestra de color rojizo comienza a gotear por el extremo inferior, colectamos desoxi-Mb libre de ditionito, quedando este retenido en la columna.

La desoxi-Mb así obtenida es anaeróbicamente concentrada mediante concentradores AMICON en centrifugadora SORVALL RC5C a 5 °C, hasta llegar a una concentración aproximada de 5 mM desoxi-Hb.

2.2) Experimento

2.2.1) *Medidas espectrofotométricas*

El espectro de absorción de hemoproteínas tales como Hb y Mb depende del ligante en la sexta posición de coordinación del hierro del grupo hemo, pudiendo dar información de la conformación del hemo y su entorno, como así también de la propia estructura de la globina (Antonini & Brunori, 1971).

Los espectros de absorción óptica en el rango visible (450-700 nm), que permiten determinar el estado conformacional de la Hb y de la Mb, son obtenidos mediante un espectrofotómetro CARY 3E UV-Vis o mediante un METROLAB 2500 UV-Vis, especialmente adaptados para el uso de nuestra celda de medición que describiremos mas adelante.

La absorbancia A de un cromóforo en una dada longitud de onda λ es, según la relación dada por la ley de Beer-Lambert, proporcional a su concentración C , al camino óptico L recorrido por el haz de luz a través de la muestra, y a su coeficiente de extinción molar $\varepsilon(\lambda)$ en esa misma longitud de onda (Cantor & Schimmel, 1980_a),

$$A(\lambda) = C \varepsilon(\lambda) L \quad (2.1)$$

tomando el camino óptico L como unitario, la ley de Beert-Lambert es

$$A(\lambda) = C \varepsilon(\lambda) \quad (2.2)$$

Si una muestra contiene n especies cromóferas, su absorbancia $A(\lambda)$ en una dada longitud de onda λ será igual a la suma de las absorbancias individuales de cada especie

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n C_i \varepsilon_i(\lambda) \quad (2.3)$$

Si la medida de absorbancia se realiza en n longitudes de onda, se obtiene un sistema de ecuaciones similares a la ecuación (2.3), con lo cual es posible determinar la concentración de cada una de las especies que componen un espectro, siempre y cuando los n valores de los coeficientes de extinción molar de todas las especies sean conocidos. En la práctica, solo puede realizarse una buena determinación de concentraciones si el espectro esta compuesto de no más de dos o tres especies cromóferas. Para el caso de dos especies, el sistema de ecuaciones se reduce a

$$A(\lambda_1) = C_1 \varepsilon_1(\lambda_1) + C_2 \varepsilon_2(\lambda_1) \quad (2.4a)$$

$$A(\lambda_2) = C_1 \varepsilon_1(\lambda_2) + C_2 \varepsilon_2(\lambda_2) \quad (2.4b)$$

que resueltas nos dan las siguientes expresiones para las concentraciones C_1 y C_2 de los dos cromóferos:

$$C_1 = [A(\lambda_1) \varepsilon_2(\lambda_2) - A(\lambda_2) \varepsilon_2(\lambda_1)] / \Delta \quad (2.5a)$$

$$C_2 = [A(\lambda_2) \varepsilon_1(\lambda_1) - A(\lambda_1) \varepsilon_1(\lambda_2)] / \Delta \quad (2.5b)$$

$$\Delta = \varepsilon_1(\lambda_1) \varepsilon_2(\lambda_2) - \varepsilon_1(\lambda_2) \varepsilon_2(\lambda_1) \quad (2.5c)$$

Para un caso que será muy frecuente a lo largo de este trabajo, donde una única especie se transforma en otra sin que haya una variación en la concentración total de los cromóferos monitoreados, se producirá la aparición de puntos isobésticos (PI). La existencia de puntos isobésticos en reacciones monitoreadas espectrofotométricamente, es considerada como fuerte evidencia de la existencia de solamente dos especies durante la reacción (Colombo, 1988). En estos puntos los coeficientes de extinción molar de ambas especies son iguales, lo que posibilita la obtención de la fracción parcial de cualquiera de las dos especies absorbentes, definiendo la razón R entre la absorbancia en una longitud de onda cualquiera y la absorbancia en un punto isobéstico.

Sea λ_1 una longitud de onda fuera del punto isobéstico, y sea λ_2 la longitud de onda correspondiente a un punto isobéstico, donde $\lambda_2 = \lambda_{PI}$, y $\varepsilon_1(\lambda_2) = \varepsilon_2(\lambda_2) = \varepsilon(\lambda_{PI})$. De esta manera

$$A(\lambda_1) = C_1 \varepsilon_1(\lambda_1) + C_2 \varepsilon_2(\lambda_1) \quad (2.6a)$$

$$A(\lambda_{PI}) = (C_1 + C_2) \varepsilon(\lambda_{PI}) \quad (2.6b)$$

dado que $C_1 + C_2 = C_T$, donde C_T es la concentración total de las especies investigadas, la razón R tendrá la forma

$$R = \frac{A(\lambda_1)}{A(\lambda_{PI})} = \frac{C_1}{C_T} \frac{\varepsilon_1(\lambda_1)}{\varepsilon(\lambda_{PI})} + \frac{C_2}{C_T} \frac{\varepsilon_2(\lambda_1)}{\varepsilon(\lambda_{PI})} \quad (2.7)$$

como C_1/C_T y C_2/C_T son las fracciones parciales y_1 e y_2 de las especies 1 y 2 respectivamente, y como $y_1 + y_2 = 1$, la ecuación (2.7) puede ser escrita como

$$R = y_1 \frac{\varepsilon_1(\lambda_1) - \varepsilon_2(\lambda_1)}{\varepsilon(\lambda_{p1})} + \frac{\varepsilon_2(\lambda_1)}{\varepsilon(\lambda_{p1})} \quad (2.8)$$

La ecuación (2.8) muestra que la razón R entre la absorbancia en λ_1 y la absorbancia en el punto isobéptico es proporcional a la fracción de una de las especies. Por lo tanto, es posible acompañar el equilibrio entre dos especies, cuyos espectros tienen por lo menos un punto isobéptico, midiendo simplemente las absorbancias en las dos longitudes de onda.

Para determinar las concentraciones y el contenido de la forma meta en las muestras, usamos los coeficientes de extinción publicados para Hb (Van Assendelft & Zijlstra, 1975) y para Mb (Bowen, 1949).

En todos los cálculos, al valor de cada absorbancia en una dada longitud de onda se le resta el valor de la absorbancia de la muestra medida en 700 nm, de manera de tener una mejor corrección de la línea de base.

2.2.2) Microbalanza de cuarzo

La técnica que utilizamos para medir el contenido de agua en films de Hb y Mb, expuestos a distintas humedades relativas (h.r.), consiste en una microbalanza de cuarzo, con la cual la medición de sorción de vapor de agua por films de materiales higroscópicos se efectúa midiendo el cambio producido en la frecuencia de resonancia del cristal con el film adherido respecto a la frecuencia del cristal limpio (Kennerley, 1969).

La frecuencia natural de un cristal resonador plano de cuarzo excitado, es extremadamente sensible a cambios producidos en el entorno del cuarzo. Los cristales pueden prepararse para ser predominantemente sensibles a la masa del entorno, o predominantemente sensibles a la temperatura, dependiendo del ángulo que forma el plato plano de cuarzo con los ejes cristalográficos. La frecuencia natural de los cristales cortados a 35 ° de los ejes cristalográficos (corte AT) es muy sensible a la masa e independiente de los cambios en temperatura y presión de gas del entorno (Cady, 1964).

Para los cristales de corte AT, como los que usamos en nuestros experimentos, la masa del film adherido es proporcional al cambio de la frecuencia natural del cristal con el film respecto a la del cristal limpio. La constante de proporcionalidad puede ser calculada a partir de la frecuencia natural y de las características del resonador.

Para el modo fundamental, el espesor d del plato plano es igual a un número entero de veces la longitud de onda. De esta manera, la frecuencia natural f esta dada por

$$f = \frac{V_r}{2d} = \frac{N}{d} \quad (2.9)$$

donde V_r es la velocidad de propagación de la onda transversal en la dirección del espesor del plato, y N es la constante de frecuencia. En el caso del cuarzo, la velocidad de propagación y la constante de frecuencia dependen de la dirección cristalográfica. Para los cristales AT planos $N=167$ kHz cm.

Diferenciando la ecuación (2.9) obtenemos

$$\frac{\Delta f}{f} = -\frac{\Delta d}{d} \quad (2.10)$$

donde Δf es el cambio en la frecuencia de resonancia producido por pequeños cambios en el espesor Δd , además

$$\Delta d = \frac{\Delta m_q}{A \rho_q} \quad (2.11)$$

donde m_q , A , y ρ_q son la masa, el área, y la densidad del cristal de cuarzo plano respectivamente. Así, la ecuación (2.10) toma la forma

$$\frac{\Delta f}{f} = -\frac{\Delta m_q}{A \rho_q d} \quad (2.12)$$

Como la superficie del cristal de cuarzo afecta a la frecuencia natural solamente a causa de su masa inerte, un film delgado de otro material, tal como proteína, depositado sobre el cristal, afecta a la frecuencia natural en la misma forma que lo haría un plato de cuarzo de igual masa. De esta forma, Δm_q puede ser reemplazado por la masa Δm del film depositado sobre el cristal,

$$\frac{\Delta f}{f} = -\frac{\Delta m}{A \rho_q d} \quad (2.13)$$

Introduciendo la constante de frecuencia $N=f d$, obtenemos

$$\Delta f = -\frac{f^2}{\rho_q N} \frac{\Delta m}{A} = -C_f \frac{\Delta m}{A} \quad (2.14)$$

donde $C_f = f^2 / N \rho_q$ es el coeficiente de sensibilidad para la determinación de la masa. Para los cristales de cuarzo de corte AT usados en nuestros experimentos, $f=6000$ kHz, $N=167$ kHz

cm, y $\rho_q=2,65 \text{ gr cm}^{-3}$, lo que da un valor para C_f de $8,13 \cdot 10^7 \text{ Hz cm}^3 \text{ gr}^{-1}$. De manera que el cambio en frecuencia de 1 Hz corresponde a un cambio de masa de aproximadamente 20 ng.

Luego, de la ecuación (2.14) obtenemos la expresión para la masa del film,

$$\Delta m = -\Delta f \frac{N \rho_q A}{f^2} \tag{2.15}$$

Los cristales de cuarzo usados en este trabajo son provistos por Cristales Argentinos S.A.. Estos cristales son circulares con un área $A=1,2 \text{ cm}^2$.

La microbalanza de cuarzo consiste entonces en un cristal de cuarzo de corte AT, plano y circular, sobre el cual se coloca el film del material higroscópico. Este cristal es conectado a un circuito excitador resonante (Mogilner, 1989) y a un frecuencímetro que registra variaciones de 1 Hz. El film de proteína es depositado uniformemente sobre una de las caras del cristal de cuarzo.

2.2.3) *Dispositivo experimental*

La Figura 2.3 muestra el esquema del dispositivo experimental utilizado en nuestros experimentos. Este dispositivo permite determinar, simultáneamente, la cantidad de agua ligada a un film de hemoproteína, y el estado conformacional asociado a tal contenido de agua.

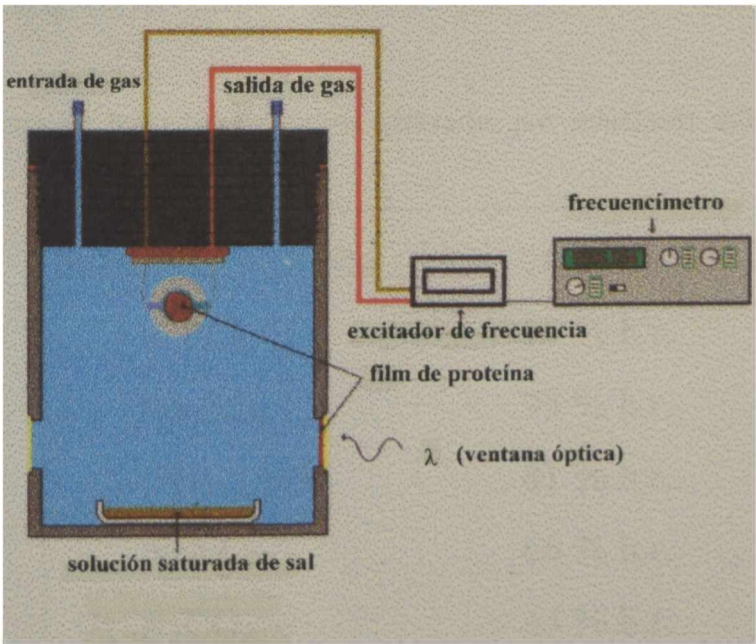


Figura 2.3 : Dispositivo experimental utilizado para la determinación simultánea del contenido de agua y la conformación asociada, en films de proteína.

La cantidad de agua ligada es obtenida mediante medidas de la masa del film depositado en el cristal de cuarzo, a través de la lectura de frecuencia. El cristal está montado en la misma celda óptica que permite determinar, a través del espectro visible, la conformación de un mismo film de hemoproteína depositado sobre una lamina de vidrio óptica.

Para la formación de los films, esparcimos menos de 10 µl de la muestra sobre la lámina de vidrio y sobre una de las caras del cristal de cuarzo.

La celda es cerrada por dos ventanas ópticas pegadas en los bordes con grasa de alto vacío, una de las ventanas contiene en su cara interior el film. La tapa de la celda, donde está montada la microbalanza de cuarzo, consiste en una rosca tallada de plástico duro con dos conductos para la entrada y salida de gas.

La celda, de forma cilíndrica y con un volumen aproximado de 60 ml, contiene un pequeño recipiente con una solución salina saturada, de manera de generar en el interior una humedad relativa (h. r.) controlada. El acceso de gas en la celda es realizado con un muy débil flujo, previamente circulado a través de dos matraces conectados conteniendo la misma solución salina saturada del interior de la celda. La Tabla 2.1 muestra los valores de humedades relativas para las diversas soluciones salinas saturadas empleadas en nuestros experimentos. Pentóxido de fósforo en polvo (P_2O_5) fue utilizado para obtener un ambiente extremadamente seco (0 % h. r.).

Tabla 2.1 : Valores de humedades relativas generadas por soluciones salinas saturadas (Schneider & Schneider , 1972).

Solución saturada	20 - 25 ° C
K_2SO_4	98 % h.r.
Na_2SO_4	93 % h.r.
$(NH_4)_2SO_4$	81 % h.r.
$NaNO_2$	66 % h.r.
K_2CO_3	43 % h.r.
$KC_2H_2O_3$	20 % h.r.
$NaOH$	7 % h.r.
P_2O_5	0 % h.r.

La celda es colocada en el espectrofotómetro para las lecturas ópticas. El cristal de cuarzo con el film es conectado a un circuito resonador y a un frecuencímetro que registra variaciones de 1 Hz. Los espectros y las lecturas de frecuencia son tomados en forma simultánea.

El peso seco del film de proteína es determinado luego de equilibración con una atmósfera seca bajo P_2O_5 durante no menos de 12 horas, de manera de deshidratar completamente la muestra. Los films de nuestros experimentos tienen un peso seco del orden de 10^{-4} gr, y un espesor d del orden de $5 \cdot 10^{-7}$ m. El contenido de agua se calcula haciendo la diferencia entre el peso del film hidratado y el peso del film seco.

Todas las medidas fueron realizadas a 22°C .

2.3) Análisis de datos

2.3.1) *Análisis cinético*

Las reacciones cinéticas estudiadas en este trabajo involucran fundamentalmente transiciones entre dos estados o especies. Estas transiciones fueron acompañadas registrando, en función del tiempo, el espectro total en la región visible. De estos espectros pueden obtenerse las absorbancias en distintas longitudes de onda, para luego a través de la ecuación (2.7), calcular la razón R de transición entre los dos estados como función del tiempo.

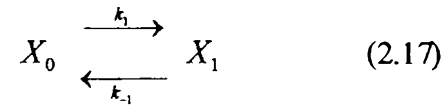
El comportamiento de $R=R(t)$ puede brindar información sobre los mecanismos moleculares involucrados en la transición. El tratamiento clásico de datos para la obtención de este tipo de información (Cantor & Schimmel, 1980) consiste en obtener la variación fraccional f como función del tiempo, definida por

$$f(t) = \frac{\Delta R(t)}{\Delta R} = \frac{R(t) - R(t=0)}{R(t=\infty) - R(t=0)} \quad (2.16)$$

que, según la ecuación (2.7), es igual a la variación fraccional de la especie presente en el tiempo infinito.

Los mecanismos que interesan en nuestro trabajo, son aquellos que involucran transiciones entre solamente dos especies o estados. En este caso la reacción puede ser unimolecular simple, o compuesta, pudiendo involucrar una o más reacciones durante la conversión de especies.

El caso más simple de reacciones reversibles es el proceso unimolecular que involucra solo una reacción para la transición entre dos especies conformacionales proteicas. Este proceso puede ser descrito como



donde X_0 y X_1 son dos estados conformacionales diferentes de la proteína. La reacción es reversible cuando k_1 y k_{-1} son diferentes de cero, e irreversible cuando k_1 ó k_{-1} es igual a cero.

La ecuación que determina la razón de transición para este mecanismo esta dada por

$$-\frac{d}{dt}[X_0] = k_1[X_0] - k_{-1}[X_1] \quad (2.18)$$

donde $[X_0]$ y $[X_1]$ representan las concentraciones de las especies. La ecuación (2.18) puede ser resuelta cambiando variables; sean $\Delta[X_0] = [X_0] - [X_0](t=\infty)$, y $\Delta[X_1] = [X_1] - [X_1](t=\infty)$, los cambios de las concentraciones respecto de los valores de equilibrio. Puesto que la conservación de la masa requiere que la concentración total $[X_0] + [X_1]$ sea constante, tenemos que $\Delta[X_0] = -\Delta[X_1]$. De esta manera la ecuación (2.18) se transforma en

$$\frac{d}{dt}\Delta[X_0] = -k\Delta[X_0] \quad (2.19)$$

donde la solución a esta ecuación diferencial esta dada por

$$\Delta[X_0] = \Delta[X_0]^0 \exp(-kt) \quad (2.20)$$

con $k = k_1 + k_2$, y con $\Delta[X_0]^0 = [X_0](t=0) - [X_0](t=\infty)$ como la desviación a $t=0$ del valor de $[X_0]$ respecto del valor de equilibrio.

La ecuación (2.20) puede ser escrita como

$$[X_0](t) = [X_0](t=\infty) + \Delta[X_0]^0 \exp(-kt) \quad (2.21)$$

que también puede expresarse en la forma

$$\exp(-kt) = \frac{[X_0](t) - [X_0](t=\infty)}{\Delta[X_0]^0} \quad (2.22)$$

La ecuación (2.22) es la variación fraccional $f(t)$ de la especie X_0 , y representa una reacción unimolecular simple, donde $[X_0](t)$ crece o decrece exponencialmente hacia su valor de equilibrio, dependiendo de las condiciones iniciales, con una constante de tiempo $\tau = k^{-1}$.

Si consideramos que la reacción representada por (2.17) ocurre hacia la derecha, y que a $t=0$ el equilibrio está totalmente desplazado hacia X_0 , la ecuación (2.16) que determina la variación fraccional de la especie X_I , tomará la forma

$$f(t) = \frac{R(t) - R(t=0)}{R(t=\infty) - R(t=0)} = 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.23)$$

haciendo $f(t) = [y(t) - y(0)] / [y(\infty) - y(0)]$, la ecuación (2.23) puede ser escrita en la forma más general

$$y(t) = y(0) + \Delta y \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right) \quad (2.24)$$

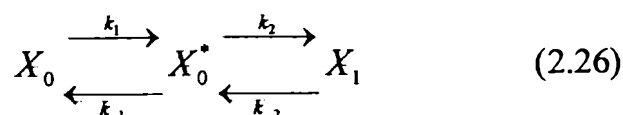
donde $\Delta y = y(\infty) - y(0)$. En la ecuación (2.24), $y(t)$ puede representar una fracción conformacional proteica, o la masa de otro ligante, en particular agua, incorporado durante la reacción, como veremos en la sección correspondiente a resultados.

El otro caso de reacción unimolecular que analizaremos es aquel en el cual, durante la conversión de una especie en otra, ocurren simultáneamente más de una reacción unimolecular simple. Esto ocurre cuando existen más de un subestado conformacional, todos ellos con idénticas características espectrales, transicionando para otro estado ópticamente distinto, con constantes de tiempo o velocidades diferentes. Como cada uno de estos estados o subestados sigue una cinética del tipo descrito por la ecuación (2.24), la cinética de todo el sistema, compuesto de n subestados, estará descrita por

$$y(t) = y(0) + \sum_{i=1}^n \Delta y_i \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \right) \quad (2.25)$$

donde Δy_i es el cambio total producido en el estado o subestado i durante la transición con constante de tiempo τ_i , donde $\sum \Delta y_i = \Delta y = y(\infty) - y(0)$.

Consideremos el caso que involucra solamente la presencia de un único intermediario, es decir aquel que involucra dos reacciones para la conversión de X_0 en X_I , y viceversa



el comportamiento funcional de $y(t)$ en este caso está dado por

$$y(t) = y(0) + \Delta y_1 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right) + \Delta y_2 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right) \quad (2.27)$$

con $\Delta y_1 + \Delta y_2 = \Delta y = y(\infty) - y(0)$, y donde τ_1 y τ_2 son las dos constantes de tiempo que dependen de los valores de las constantes de equilibrio k_1 , k_{-1} , y k_2 , k_{-2} .

La ecuación (2.27) representa un proceso bifásico, con parámetros τ_1 y τ_2 caracterizando las dos fases, cada uno de estos parámetros envuelve expresiones que contienen las constantes de equilibrio de ambos procesos elementales involucrados en la transición.

El ajuste de las ecuaciones cinéticas a los puntos experimentales fue realizado con el programa ORIGIN 5.0.

2.3.2) *Isotermas de sorción de vapor de agua. Tratamiento mecánico-estadístico*

Existe una dependencia entre la cantidad de agua tomada por una sustancia y la presión de vapor de agua de la atmósfera con la cual la sustancia está en equilibrio. La relación entre contenido de agua y presión de vapor, a una cierta temperatura, define la isoterma de sorción de vapor de agua por dicha sustancia.

Las isotermas experimentales han sido clasificadas en cinco tipos diferentes (Brunauer, 1945). Sorción de agua por proteínas, ácidos nucleicos, y complejos sistemas biológicos, incluyendo alimentos parcialmente disecados, corresponden a un mismo tipo de isoterma (Mogilner, 1989).

Han sido propuestos modelos para las isotermas de sorción de agua (Brunauer, 1945), pero en estos modelos existe una interpretación errónea del fenómeno ya que utilizan argumentos cinéticos para describir un problema de equilibrio como es el de la isoterma de sorción. Un tratamiento mas adecuado puede hacerse en el marco de la mecánica estadística (Guggenheim, 1966).

En el formalismo de la mecánica estadística, el número η de moléculas de agua ligadas a la macromolécula, a una cierta temperatura T y a una cierta presión de vapor, esta dado, en el ensemble gran canónico, por la siguiente expresión

$$\eta = \lambda \frac{\partial}{\partial \lambda} \ln \Xi \quad (2.28)$$

donde Ξ es la gran función de partición, y λ es la actividad absoluta del vapor, vinculada al potencial químico μ mediante la expresión $\lambda = \exp(\mu/RT)$, con $R=8,314 \text{ J } ^\circ\text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ como la constante de los gases.

Para computar la gran función de partición, consideramos N sitios localizados e idénticos de sorción que pueden ser llenados independientemente. Si sobre cada uno de estos

sitios pueden acomodarse no una, sino varias moléculas de agua, la gran función de partición puede ser escrita como

$$\Xi = \left(1 + \lambda q_1 + \lambda^2 q_1 q_2 + \lambda^3 q_1 q_2 q_3 + \dots\right)^N \quad (2.29)$$

donde q_i ($i=1, 2, 3, \dots$) es la función de partición de una partícula sorbida en el sitio i , definida por $q_i = \sum_r \exp(-\varepsilon_r/kT)$, siendo ε_r la energía de cualquier estado posible de la molécula, $k=R/N_A=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J } ^\circ\text{K}^{-1}$ la constante de Boltzman, y $N_A=6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ es el número de Avogadro. A partir de q_i puede definirse el potencial termodinámico estándar para el sitio i -ésimo como

$$\mu_i^0 = -RT \ln q_i \quad (2.30)$$

donde estándar se refiere a total ocupación del sitio i .

Para resolver la ecuación (2.28) es necesario dar una expresión para las q_i . Introducimos la aproximación en la que todas las moléculas de agua, excepto la primera de cada sitio (moléculas en la primera capa), tienen la misma función de partición, proporcional a la primera, esto es $q_2=q_3=q_4=\dots=q$, y $q_1=cq$, donde c es un parámetro de proporcionalidad. Es físicamente obvio que para una superficie fuertemente absorbente $c \gg 1$. La suposición que todas las moléculas de las capas superiores (multicapas) poseen idéntica función de partición es solo una aproximación, de manera que q debe considerarse como un valor promedio. Con esta aproximación, la ecuación (2.29) se transforma en

$$\Xi = \left(1 + \lambda cq + \lambda^2 cq^2 + \lambda^3 cq^3 + \dots\right)^N \quad (2.31)$$

De esta forma, la gran función de partición Ξ consiste en N factores idénticos, uno para cada sitio. En cada factor los sucesivos términos dan las probabilidades relativas de ocupación de un sitio por cero, una, dos, tres, ..., moléculas.

Usando la fórmula para la suma de progresiones geométricas, podemos escribir la ecuación (2.31) como

$$\Xi = \left(\frac{1 + (c-1)\lambda q}{1 - \lambda q} \right)^N \quad (2.32)$$

con la cual a través de la ecuación (2.28) obtenemos finalmente la expresión

$$\eta = \frac{Nc\lambda c}{(1 + (c-1)\lambda q)(1 - \lambda q)} \quad (2.33)$$

Puesto que la macromolécula está en equilibrio con el gas, vapor de agua en nuestro caso, el valor de λ es igual al del gas, y es proporcional a la presión de vapor p ; mientras

que q es independiente de p . Es decir, $\lambda q = p/p^*$, donde p^* , al igual que c , es un parámetro característico de la superficie macromolecular, del gas, y de la temperatura, pero independiente de la presión.

La isoterma de sorción de vapor de agua puede ser escrita entonces como

$$\eta(p) = \frac{Nc(p/p^*)}{(1 + (c-1)(p/p^*))^{1-(p/p^*)}} \quad (2.34)$$

donde p es la presión parcial de vapor de agua ($0 \leq p \leq 1$); y N , c , y p^* son parámetros a ajustar con los datos experimentales. El valor $\eta = \eta(p)$ corresponde a la cantidad de agua sorbida expresada en gramos de agua por gramo de proteína, o en mol H_2O / mol de proteína, a la presión de vapor p .

Una interpretación adecuada de los parámetros revela que N , expresado en las unidades correctas, es igual al número de sitios primarios de sorción. Además, según la ecuación (2.30) podemos escribir

$$\mu_{multicapa}^0 = \mu_L + RT \ln(p^*/p^0) \quad (2.35)$$

donde p^0 es la presión de vapor saturado ($p^0=1$), y μ_L es el potencial termodinámico del líquido. De la misma forma podemos expresar

$$\mu_1^0 = \mu_L - RT \ln(cp^0/p^*) \quad (2.36)$$

de manera que, según la ecuación (2.35), $p^* = p^0 \exp[(\mu_{multicapa}^0 - \mu_L)/RT]$ es una medida de las propiedades termodinámicas del promedio de las moléculas en las multicapas; en tanto que, según la ecuación (2.36), $c = (p^*/p^0) \exp[-(\mu_1^0 - \mu_L)/RT]$ da cuenta de las propiedades termodinámicas en la primera capa (Grigera, 1972; Berendsen, 1975).

Es a menudo útil conocer la fracción del total de agua presente que se encuentra fija a los sitios primarios. La suposición más elemental es la de que ninguna molécula de agua puede pasar a la multicapa hasta que todos los sitios primarios de sorción estén ocupados. Esta suposición es muy simplista. Un estudio más realista puede realizarse considerando a las moléculas de agua en diferentes estados (Grigera, 1972). Del significado de los términos de la ecuación (2.31), considerando que l es proporcional a la probabilidad relativa de encontrar un sitio vacío, tendremos entonces que l es proporcional al número S_0 de sitios vacíos; asimismo, $(1 + \lambda cq + \lambda^2 cq^2 + \lambda^3 cq^3 + \dots)$ es proporcional al número total de sitios primarios N (Grigera, 1972). De esta manera podemos escribir

$$\frac{S_0}{N} = \frac{1}{1 + \lambda cq + \lambda^2 cq^2 + \lambda^3 cq^3 + \dots} = \frac{1 - \lambda q}{1 + (c-1)q\lambda} \quad (2.37)$$

como N es el número de sitios primarios de unión y S_0 es el número de sitios vacíos, la razón de número de sitios ocupados a número de sitios totales será

$$\frac{N - S_0}{N} = 1 - \frac{S_0}{N} \quad (2.38)$$

que es igual a la probabilidad de encontrar un sitio ocupado. Así, la fracción f de moléculas totales que están fijadas a S sitios primarios puede ser escrita como

$$f = \frac{S}{\eta} \left[1 - \frac{S_0}{N} \right] \quad (2.39)$$

utilizando las ecuaciones (2.34) y (2.37), y recordando que $\lambda q = p/p^*$, tenemos que

$$f = \frac{S}{N} \left(1 - \frac{p}{p^*} \right) \quad (2.40)$$

considerando el caso particular donde todos los sitios primarios son sitios de unión, es decir $S = N$, obtenemos finalmente la expresión para f , en función de la presión de vapor de agua p , dada por

$$f = \left(1 - \frac{p}{p^*} \right) \quad (2.41)$$

de donde puede calcularse el porcentaje de ocupación de sitios primarios Π , según la ecuación

$$\Pi(p) = 100 \frac{\eta(p)}{N} f(p) \quad (2.42)$$

La energía libre necesaria para transferir una molécula desde el vapor a la superficie sólida puede expresarse como (Schoenborn & Hanson, 1980)

$$\Delta F = \frac{RT}{M} \int_0^p \eta \frac{dp}{p} \quad (2.43)$$

donde $R=8,314 \text{ J}^\circ\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, y M el peso molecular del adsorbato. La isoterma de Guggenheim dada por (2.34) permite obtener una expresión analítica convergente de la energía libre para $p^* > p$. De esta forma, la diferencia de energía libre puede entonces escribirse como

$$\Delta F(p) = \left(\frac{RT}{M} \right) \ln \frac{1 + (c-1)(p/p^*)}{1 - p/p^*} \quad (2.44)$$

donde ΔF es expresada en unidades de J/gr Hb, y representa la energía libre necesaria para transferir agua desde el vapor a la superficie proteica, a una dada presión de vapor de agua p .

El ajuste de la isoterma de sorción dada por la ecuación (2.34) a los puntos experimentales fue realizado con el programa MATHEMATICA 4.0.

3- Resultados

3.1) Agua y estructura

La interacción del agua con una proteína es crucial para estabilizar la estructura nativa. En esta sección, investigamos los cambios conformacionales producidos por la variación en el contenido de agua de hidratación en films de meta-Hb. De esta forma, estudiamos la cinética y el equilibrio conformacional inducido por la alteración del estado de hidratación de la proteína expuesta a diferentes actividades de agua, y la irreversibilidad producida por el secado. La técnica experimental descrita en la sección 2.2.3, permite determinar la relación entre el contenido de agua en la proteína y la conformación asociada.

3.1.1) *Cinética de la transición meta-Hb \rightleftharpoons hemicromo inducida por la cantidad de agua de hidratación*

La Figura 3.1 muestra los espectros en el rango 450-700 nm obtenidos en función del tiempo durante el proceso de reconversión de hemicromo en meta-Hb. Los films son preparados a partir de la solución muestra de meta-Hb descrita en la sección 2.1.2, esparciendo menos de 10 μ l sobre la lámina de vidrio óptico y sobre una cara del cristal de cuarzo. Ambos films son expuestos a la humedad del laboratorio (~ 50 % h.r.) durante mas de 60 minutos y luego introducidos en la celda de medición (esquemmatizada en la Figura 2.3), la que contiene una solución saturada de K_2SO_4 que genera una humedad relativa del 98 % en su interior, en ambiente aeróbico. Inmediatamente, varios espectros son tomados en

función del tiempo simultáneamente con la lectura de la frecuencia de resonancia del cristal, que determina la masa del film. Estos registros son realizados hasta que el sistema llegue al equilibrio, caracterizado por la ausencia de cambios espectrales y de lectura de masa.

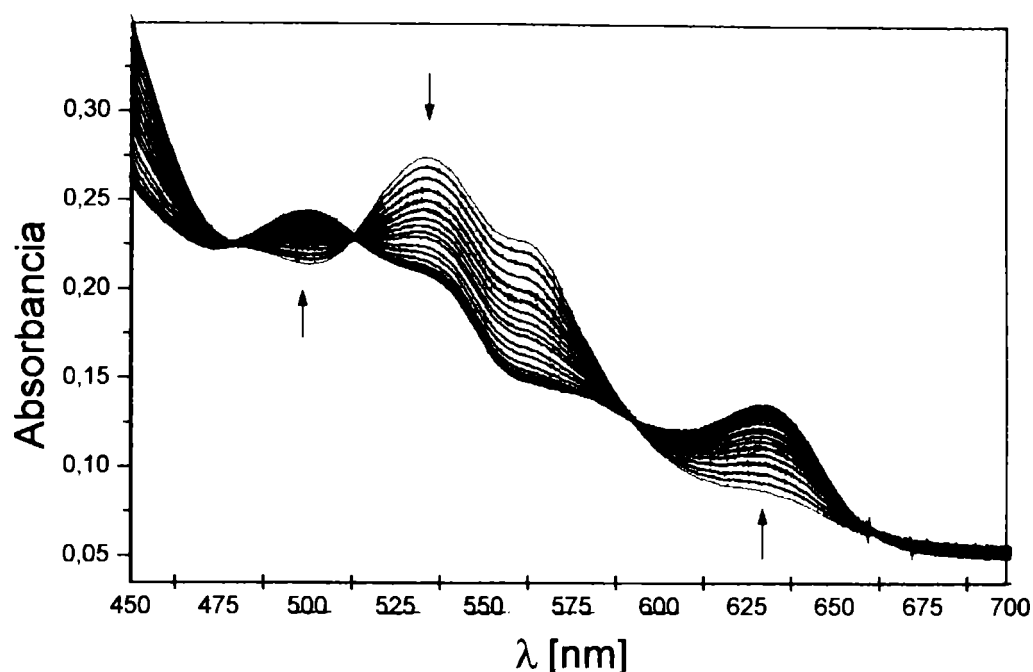


Figura 3.1 : Espectros ópticos registrados en función del tiempo durante el proceso de rehidratación del film a 98 % h.r., que induce la reconversión de hemicromo a meta-Hb. Las flechas indican la dirección de los cambios espectrales producidos con respecto al espectro inicial (—)

En la Figura 3.1, el espectro inicial, representado en color verde, presenta un pico de absorción en 536 nm y un hombro próximo a 565 nm, característicos del derivado hemicromo en hemoproteínas (Keilin & Hartree, 1952). La formación de hemicromo exige cambios de la conformación proteica, al menos en la región distal al grupo hemo, puesto que, en este derivado conformacional, la sexta posición de coordinación del hierro está ocupada por la histidina distal, unida a través de un enlace Fe-N₂ (Perutz & col., 1974); mientras que para la meta-Hb la sexta posición está ocupada por agua (Perutz, 1970; Perutz, 1976). Los espectros finales presentan picos de absorción en 500 y 630 nm, típicos del derivado meta-Hb en solución (Antonini & Brunori, 1971)

Las bandas de absorción características del hemicromo decrecen en intensidad a medida que aumenta el tiempo de exposición del film a 98 % h.r.. De la misma forma, se produce un incremento en las bandas a 500 y 630 nm, indicando la tendencia del hemicromo a convertirse en meta-Hb.

Otra característica de los espectros mostrados en la Figura 3.1 es la presencia de cuatro puntos isosbéticos en las longitudes de onda de 485, 519, 595, y 660 nm, sugiriendo

que solamente los dos derivados, hemicromo y meta-Hb, están presentes en el film. Puntos isobésticos muy próximos a estos fueron también observados para la reacción inversa inducida por deshidratación (Colombo, 1988; Colombo & Sanches, 1990), por enfriamiento (Iizuka & Kotani, 1969), por alta presión (Ogunmola & col., 1977) e inducida por la adición de glicerol en solución (Anusiem & col., 1976), y por salicilato de sodio en solución (Rachmilewitz & col., 1971).

La existencia de solo dos cromóforos en el film permite calcular, a través de los espectros, la razón de transición R en función del tiempo mediante la ecuación (2.7). En el presente caso tomamos $\lambda_I = 630$ nm, y $\lambda_{PI} = 595$ nm, donde las absorbancias en estas longitudes de onda fueron medidas tomando como línea de base la absorbancia en 700 nm. En ausencia del derivado meta-Hb, $R = 0,4$ (valor que corresponde a 100 % de hemicromo obtenido al equilibrar el film con ambiente seco en $P_2 O_5$); mientras que $R = 1,3$ corresponde a 100 % de meta-Hb (valor obtenido para meta-Hb en solución tampón fosfato 0,1 M + NaCl 0,1 M, pH 7).

La razón de transición en función del tiempo, $R = R(t)$, es usada para calcular, a partir de la ecuación (2.16), la evolución temporal de la fracción de meta-Hb durante el proceso de hidratación del film expuesto a 98 % h.r.. En la Figura 3.2 esta representada la fracción de meta-Hb, $f_{meta-Hb}$, en función del tiempo transcurrido del proceso.

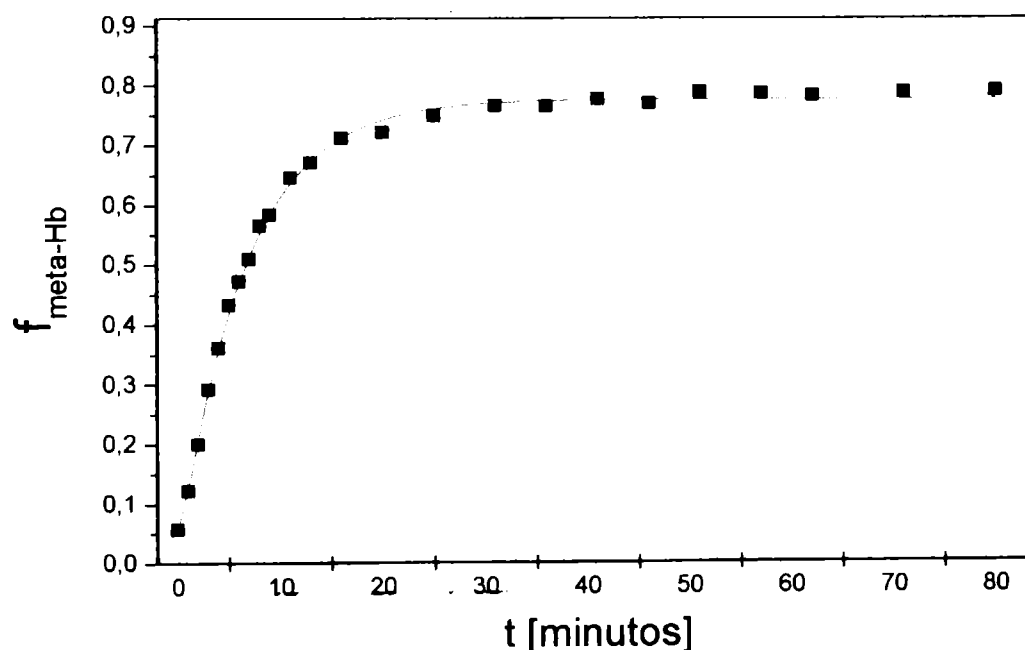


Figura 3.2 : Cinética de la reconversión de hemicromo en meta-Hb para el film expuesto a 98 % h.r. La curva que conecta los valores experimentales corresponde al mejor ajuste logrado mediante la función bi-exponencial

$$f_{meta-Hb}(t) = f_{meta-Hb}^{i=0} + A_{f1} \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_{f1}} \right) \right) + A_{f2} \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_{f2}} \right) \right)$$

que representa un proceso bifásico con constantes de tiempo $\tau_{f1} = 6,43 \pm 0,18$ min, y $\tau_{f2} = 0,46 \pm 0,01$ min.

Puede observarse en la Figura 3.2 que alcanzado el equilibrio del film expuesto a 98 % h.r., existe aproximadamente un 20 % de hemicromo presente. Esta porción de hemicromo solo es reconvertida en meta-Hb cuando, al final del experimento, diluimos el film en tampón fosfato 0,1 M + NaCl 0,1 M, pH 7 . Esta dilución arroja un valor de $R=1,26$ que corresponde a 96 % de meta-Hb.

La curva que conecta los puntos experimentales en la Figura 3.2 representa un comportamiento bifásico con dos constantes de tiempo de transición, τ_{f1} y τ_{f2} . Este comportamiento es típico de dos situaciones distintas, una posibilidad refleja la existencia de dos procesos simples, uno independiente del otro, lo que estaría indicando la existencia de dos poblaciones de meta-Hb con velocidades distintas de conversión; la otra posibilidad indica la presencia de un intermediario en la transición hemicromo \rightarrow meta-Hb. La presencia de puntos isosbéticos en la reacción, como muestra la figura 3.1, es inconsistente con esta última posibilidad.

Para determinar la cantidad de agua sorbida por el film durante el proceso de hidratación, medimos la frecuencia del cristal con el film simultáneamente con las medidas espectrofotométricas. Luego, a través de la ecuación (2.15), obtenemos la masa del film hidratado. La diferencia entre la masa del film hidratado y la masa del film seco (medida realizada al finalizar el experimento) determina la cantidad de agua ligada al film. Esta cantidad de agua puede ser expresada en gramos de agua por gramo de proteína seca (h), o en mol H_2O por mol Hb (n_w).

En la Tabla 3.1 mostramos los valores medidos de la frecuencia f_f del cristal con el film de proteína, en función del tiempo de hidratación; y el valor de f_f obtenido luego de deshidratar completamente el film, al finalizar el experimento, en un ambiente seco con P_2O_5 durante más de 12 horas. También están presentados en la Tabla 3.1 los valores del cambio de frecuencia $\Delta f = (f - f_f)$, donde $f = 6000$ kHz es la frecuencia de resonancia para los cristales de cuarzo limpios usados en nuestros experimentos. Estos valores de Δf permiten determinar por medio de la ecuación (2.15) la masa m del film, a la que se resta la masa m_d del film seco para obtener la masa de agua m_w ligada al film. Una vez calculado el número m_w , se obtiene trivialmente la cantidad h en gramos de agua por gramos de proteína seca, y luego n_w en mol de agua por mol de Hb.

Tabla 3.1 : Valores de la cantidad de agua ligada y de la fracción de meta-Hb asociada, en función del tiempo de hidratación del film expuesto a una atmósfera aeróbica de 98 % h.r. Se muestra también el valor del peso seco del film, obtenido luego de equilibrarlo con una atmósfera seca con pentóxido de fósforo, durante no menos de 12 horas.

<i>t</i> [min]	<i>f_f</i> [kHz]	- <i>Δf</i> [kHz]	<i>m</i> [10 ⁻⁴ gr]	<i>m_w</i> [10 ⁻⁵ gr]	<i>h</i> [gr H ₂ O/gr Hb]	<i>n_w</i> [mol H ₂ O/mol Hb]	<i>f_{meta-Hb}</i>
0	5989,023	11,421	1,7771	2,4554	0,1603	575,3	0,056
1	5988,656	11,788	1,8342	3,0264	0,1976	709,1	0,122
2	5988,406	12,038	1,8731	3,4154	0,2230	800,2	0,199
3	5988,202	12,242	1,9048	3,7328	0,2437	874,6	0,292
4	5988,053	12,391	1,9280	3,9647	0,2589	928,9	0,361
5	5987,939	12,505	1,9458	4,1421	0,2704	970,5	0,432
6	5987,848	12,596	1,9599	4,2837	0,2797	1003,7	0,472
7	5987,773	12,671	1,9716	4,4004	0,2873	1031,0	0,509
8	5987,702	12,742	1,9827	4,5108	0,2945	1056,9	0,565
9	5987,645	12,799	1,9915	4,5995	0,3003	1077,7	0,583
11	5987,534	12,910	2,0088	4,7723	0,3116	1118,2	0,645
13	5987,439	13,005	2,0236	4,9201	0,3212	1152,8	0,671
16	5987,313	13,131	2,0432	5,1161	0,3340	1198,7	0,711
20	5987,174	13,270	2,0648	5,3324	0,3482	1249,4	0,721
25	5987,029	13,415	2,0874	5,5580	0,3629	1302,2	0,749
31	5986,891	13,553	2,1088	5,7728	0,3769	1352,6	0,765
36	5986,796	13,648	2,1236	5,9206	0,3866	1387,2	0,764
41	5986,714	13,730	2,1364	6,0482	0,3949	1417,1	0,776
46	5986,642	13,802	2,1476	6,1602	0,4022	1443,4	0,769
51	5986,578	13,866	2,1575	6,2598	0,4087	1466,7	0,788
57	5986,511	13,933	2,1680	6,3640	0,4155	1491,1	0,785
62	5986,464	13,980	2,1753	6,4372	0,4203	1508,3	0,782
71	5986,386	14,058	2,1874	6,5585	0,4282	1536,7	0,788
80	5986,398	14,046	2,1854	6,5402	0,4273	1533,1	0,799

	<i>f_f</i> [kHz]	- <i>Δf</i> [kHz]	<i>m_d</i> [10 ⁻⁴ gr]
P ₂ O ₅	5990,601	9,843	1,5316

La Figura 3.3 muestra el número *n_w* de moles de agua por mol de Hb en función del tiempo transcurrido del proceso de hidratación. Podemos observar en la Figura 3.3 que el film logra el equilibrio (*n_w*=1533 mol H₂O/mol Hb, o *h*= 0,4273 gr H₂O/gr Hb) con la humedad relativa del 98 % luego de 70 minutos de exposición, mientras que, como muestra la Figura 3.2, la fracción final de meta-Hb alcanza su valor de equilibrio luego de 40 minutos de exposición a la alta humedad.

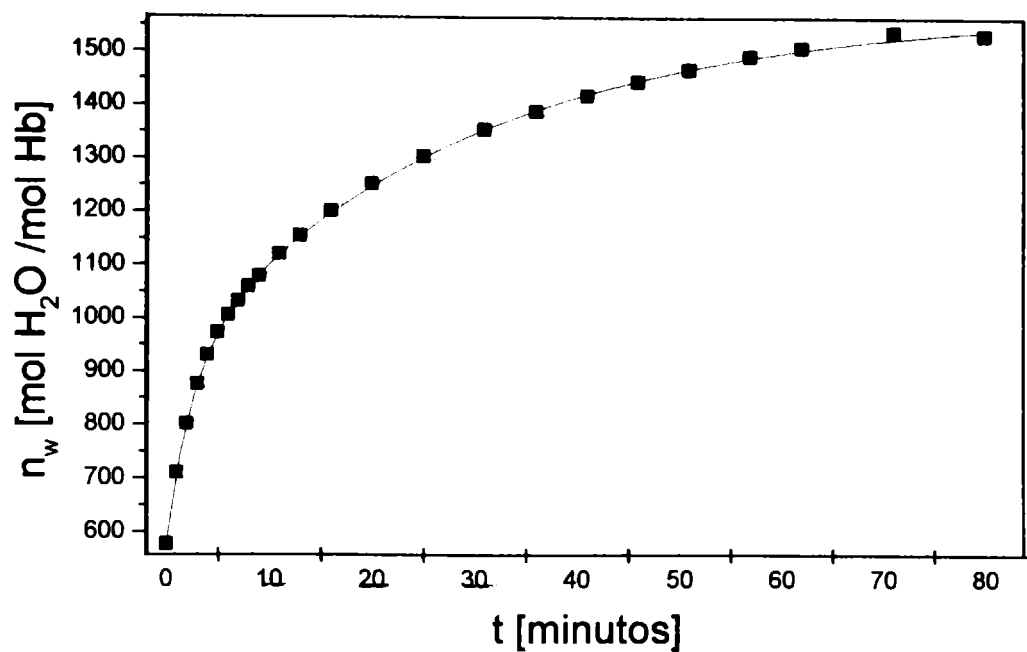


Figura 3.3 : Gráfica de la cantidad de agua n_w ligada durante el proceso de hidratación del film a 98 % h.r.. La curva que conecta los puntos experimentales corresponde al mejor ajuste logrado con la función bi-exponencial
$$n_w(t) = n_w^{t=0} + \Delta_{w1} \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_{w1}} \right) \right) + \Delta_{w2} \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_{w2}} \right) \right)$$
 que representa un proceso bifásico con constantes de tiempo $\tau_{w1}=28,69 \pm 0,80$ min, y $\tau_{w2}=2.55 \pm 0,10$ min.

La función bi-exponencial que conecta los puntos experimentales en la Figura 3.3 presenta dos constantes de tiempo, τ_{w1} y τ_{w2} , indicando la existencia de dos procesos independientes para la sorción de agua, uno rápido y otro lento. Este comportamiento bifásico es análogo al que observamos en la transición hemicromo \rightarrow meta-Hb monitoreada ópticamente.

La Tabla 3.2 permite comparar los valores de los parámetros de la función bi-exponencial dada por la ecuación (2.27), ajustados según los datos experimentales de la cinética de conversión de hemicromo a meta-Hb, y de la cinética de sorción de agua.

Tabla 3.2 : Valores de los parámetros ajustados para las cinéticas de la transición de hemicromo a meta-Hb, y de la sorción de agua. Los datos cinéticos mostrados en la Figura 3.2 y en la Figura 3.3 son modelados usando la función biexponencial dada por la ecuación (2.27)

$$y(t) = y^{t=0} + \Delta_{y1} \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_{y1}} \right) \right) + \Delta_{y2} \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_{y2}} \right) \right)$$

con $y=f_{meta-Hb}$ ó n_w , y donde Δ_{yi} esta expresado en las mismas unidades de y , y τ_{yi} está expresado en minutos.

Tipo de proceso	$y^{t=0}$	Δ_{y1}	Δ_{y2}	τ_{y1}	τ_{y2}	τ_{y1} / τ_{y2}
conversión a meta-Hb	$0,05 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$6,43 \pm 0,18$	$0,46 \pm 0,01$	13,97
sorción de agua	$575,9 \pm 3,7$	$674,1 \pm 5,0$	$332,2 \pm 7,3$	$28,69 \pm 0,80$	$2,55 \pm 0,10$	11,25

Puede observarse en la Tabla 3.2 que la conversión a meta-Hb y la sorción de agua evolucionan temporalmente con constantes de tiempo diferentes, siendo mas lento el proceso de sorción de agua. Las dos constantes de tiempo indican que cada proceso se realiza con dos velocidades, de esta manera, la conversión a meta-Hb y la sorción de agua están cada uno a su vez constituidos por dos procesos independientes, uno rápido y otro lento.

En la Figura 3.4 se encuentra representado el contenido de agua en el film, n_w , en función de la fracción de meta-Hb presente.

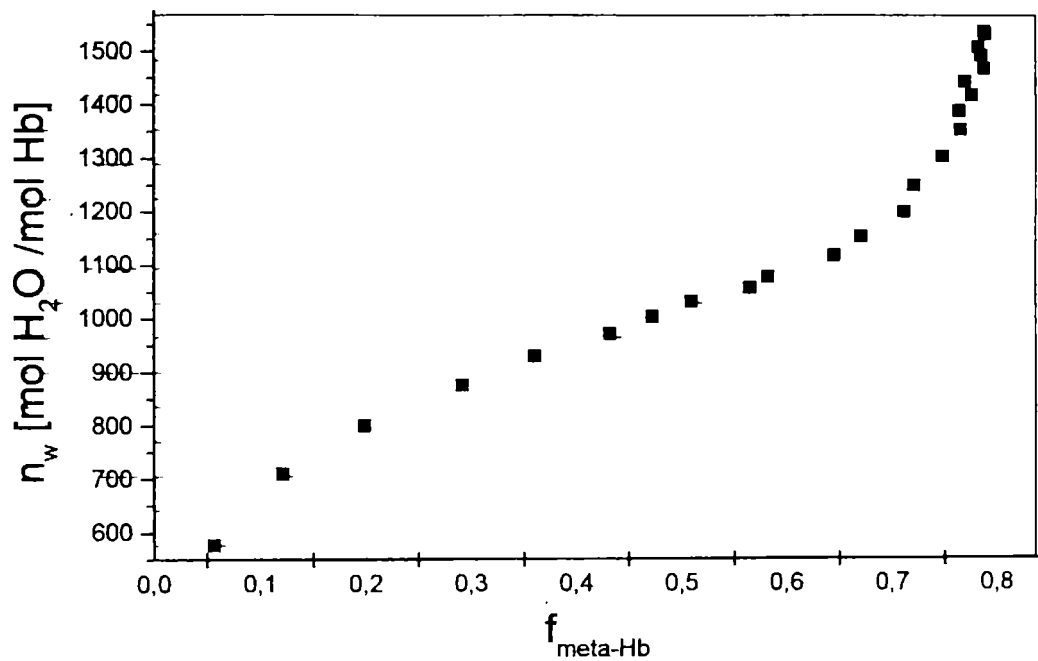


Figura 3.4 : Gráfica de n_w en función de $f_{\text{meta-Hb}}$ determinada a partir de los datos cinéticos de hidratación del film en un ambiente aeróbico a 98 % h.r. mostrados en la Tabla 3.1.

La Figura 3.4 muestra que el contenido de agua y la fracción de meta-Hb presente en el film no están relacionados linealmente, como es de esperar ya que ambos procesos ocurren con velocidades diferentes.

Resultados similares a este experimento se obtienen cuando el film es expuesto a una humedad del 7 %, y luego rehidratado en la humedad del 98 %. Estos resultados muestran la reversibilidad de los procesos de conversión de hemicromo en meta-Hb y de sorción de agua cuando se deshidrata parcialmente la muestra hasta 7 % h.r., que corresponde a un contenido de agua crítico $n_w=231$ mol H₂O / mol Hb, o $h=0,0625$ gr H₂O / gr Hb.

3.1.2) *Isotermas de sorción de vapor de agua y curvas de equilibrio para meta-Hb / hemicromo en función de la humedad relativa y de la hidratación*

La cantidad de agua de hidratación h ó n_w sorbida por la proteína en función de la humedad relativa con la que se encuentra en equilibrio, a una dada temperatura T , está dada por la isoterma de hidratación. En la Figura 3.5 se encuentran representadas las isotermas de hidratación a 22 °C obtenidas en nuestro laboratorio, para el film de meta-Hb nativo, y el ciclo completo de sorción-desorción para el film luego del secado en P_2O_5 . El contenido de agua es n_w en mol H_2O / mol Hb, la humedad con la que es equilibrada la muestra se encuentra expresada por $p = \% \text{ h.r.} / 100$. La curva que conecta los puntos experimentales corresponde al mejor ajuste realizado con la isoterma de Guggenheim dada por la ecuación (2.34).

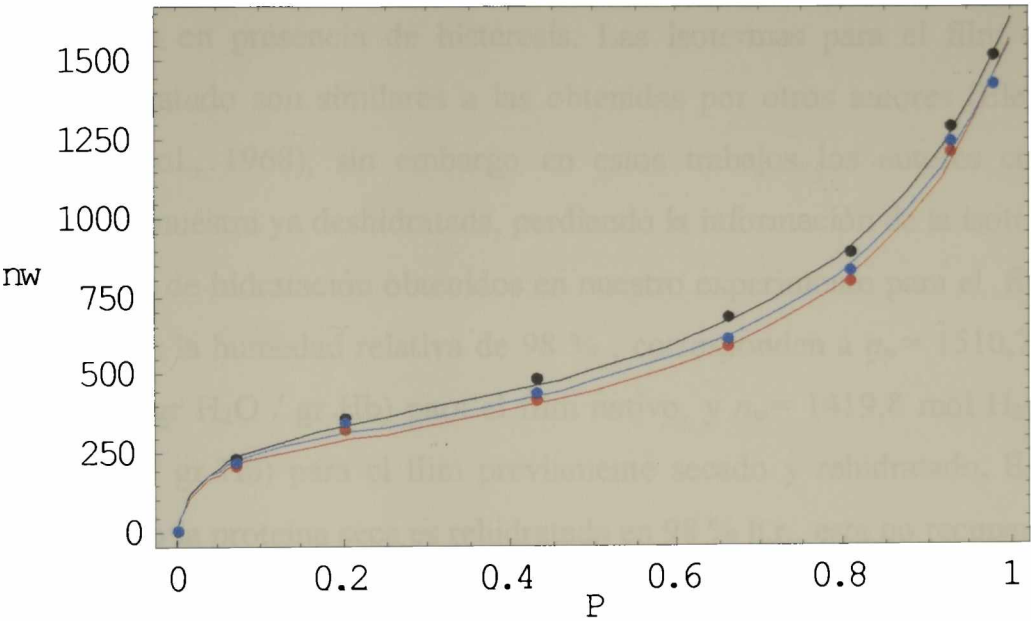


Figura 3.5 : Isotermas de sorción de agua por meta-Hb/hemicromo a 22 °C, donde —●— corresponde a la desorción nativa, —●— a la sorción luego del secado completo, y —●— representa la desorción luego del secado y rehidratación. La función que conecta los valores experimentales representa el mejor ajuste logrado con la fórmula de Guggenheim dada por

$$n_w(p) = \frac{Nc(p/p^*)}{(1 + (c-1)(p/p^*))^{1/(1-(p/p^*))}}$$

con parámetros N , c , y p^* , cuyos valores están dados en la Tabla 3.3

Los films de meta-Hb son preparados en forma idéntica a la descrita en la sección 3.1.1 y luego equilibrados en la celda de medición a la humedad relativa del 98 % en ambiente aeróbico. El equilibrio, caracterizado por la ausencia de cambios en la lectura de masa y en los espectros ópticos, es logrado por exposición de los films a cada humedad

durante no menos de 90 minutos. El secado total se logra introduciendo polvo de pentóxido de fósforo en el recipiente de la celda de medición durante más de 12 horas.

Tabla 3.3 : Valores de los parámetros de Guggenheim ajustados para los procesos de desorción nativa, sorción luego del secado completo, y desorción luego del secado y rehidratación.

Tipo de proceso	N [mol H ₂ O/mol Hb]	c	p^*
desorción nativa	321,584	37,6795	1,24208
sorción luego del secado	271,812	43,7043	1,20803
desorción luego del secado y rehidratación	294,087	42,9077	1,23007

Puede verse en la Figura 3.5 que cuando la proteína es completamente deshidratada se convierte en un material diferente desde el punto de vista de la isoterma de sorción. El film deshidratado presenta el comportamiento normal exhibiendo la característica regular de la sorción-desorción en presencia de histéresis. Las isotermas para el film de meta-Hb previamente deshidratado son similares a las obtenidas por otros autores (Eley & Leslie, 1964; Brausse & col., 1968), sin embargo en estos trabajos los autores comienzan el experimento con la muestra ya deshidratada, perdiendo la información de la isoterma nativa.

Los valores de hidratación obtenidos en nuestro experimento para el film de meta-Hb en equilibrio con la humedad relativa de 98 % , corresponden a $n_w= 1510,7$ mol H₂O / mol Hb ($h=0,4210$ gr H₂O / gr Hb) para el film nativo, y $n_w= 1419,8$ mol H₂O / mol Hb ($h=0,3956$ gr H₂O / gr Hb) para el film previamente secado y rehidratado. Estos valores muestran que cuando la proteína seca es rehidratada en 98 % h.r., esta no recupera el total de la cantidad de agua de hidratación que poseía inicialmente el film, equilibrado en la misma humedad, antes de ser secado completamente. Esta irreversibilidad no se observa cuando la muestra es deshidratada en una humedad de 7 %, como vimos en la sección 3.1.1. En el experimento de la sección 3.1.1, el contenido de agua medido para el film en equilibrio con la humedad de 98 % es muy próximo al obtenido para el film nativo del presente experimento en equilibrio con la misma humedad.

De los parámetros de sorción mostrados en la Tabla 3.3 puede verse que el número de sitios primarios de sorción, N , decrece por el secado, sugiriendo que se producen cambios conformacionales dramáticos luego de la deshidratación total. Cuando una estructura proteica flexible es deshidratada, se espera que la misma se vuelva más hidrofóbica, puesto que en ausencia de agua los grupos polares de la proteína presentan una tendencia a interactuar entre sí, esto produciría la disminución del número de sitios primarios de sorción.

La Figura 3.6 muestra la energía libre ΔF necesaria para transferir agua desde la fase vapor al film de proteína, en función de la humedad relativa p . La curva, dada por la ecuación (2.44), es modelada para los tres procesos con los valores de los parámetros dados en la Tabla 3.3.

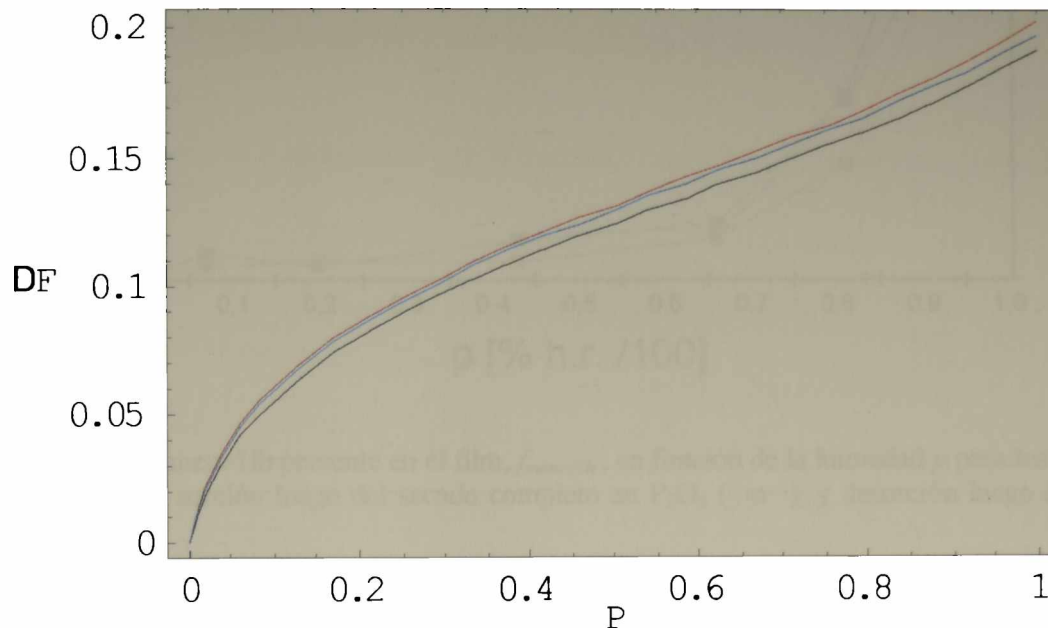


Figura 3.6 : Gráfica de ΔF en función de p para los procesos de: desorción nativa (—), sorción luego del secado completo (—), y desorción luego del secado total y rehidratación (—). ΔF es expresada en unidades de J gr^{-1} , y está dada por la función

$$\Delta F = \left(\frac{RT}{M} \right) \ln \left(\frac{1 + (c-1)(p/p^*)}{1 - p/p^*} \right)$$

donde $R=8,314 \text{ J}^\circ\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$, $T=295 \text{ }^\circ\text{K}$, $M=64650 \text{ gr mol}^{-1}$ es el peso molecular de la Hb; c y p^* son los parámetros de la isoterma de Gugenheim mostrados en la Tabla 3.3.

Puede verse en la Figura 3.6 que luego de deshidratar completamente el film se requiere de una mayor cantidad de energía para ligar agua en una dada humedad relativa, en comparación con el film nativo.

Simultáneamente con las medidas de masa fueron tomados los espectros ópticos en el rango 450-700 nm. Los espectros tomados en cada h.r. muestran los mismos puntos isosbéticos que los hallados en la cinética de la sección 3.1.1, indicando que solo dos especies conformacionales están presentes en el film: hemicromo y meta-Hb. Con la información de estos espectros obtenidos en estados de equilibrio, podemos calcular, en forma similar a la realizada en la sección 3.1.1, la fracción de meta-Hb, $f_{\text{meta-Hb}}$, en función de la humedad relativa, para los tres procesos, como se muestra en la Figura 3.7.

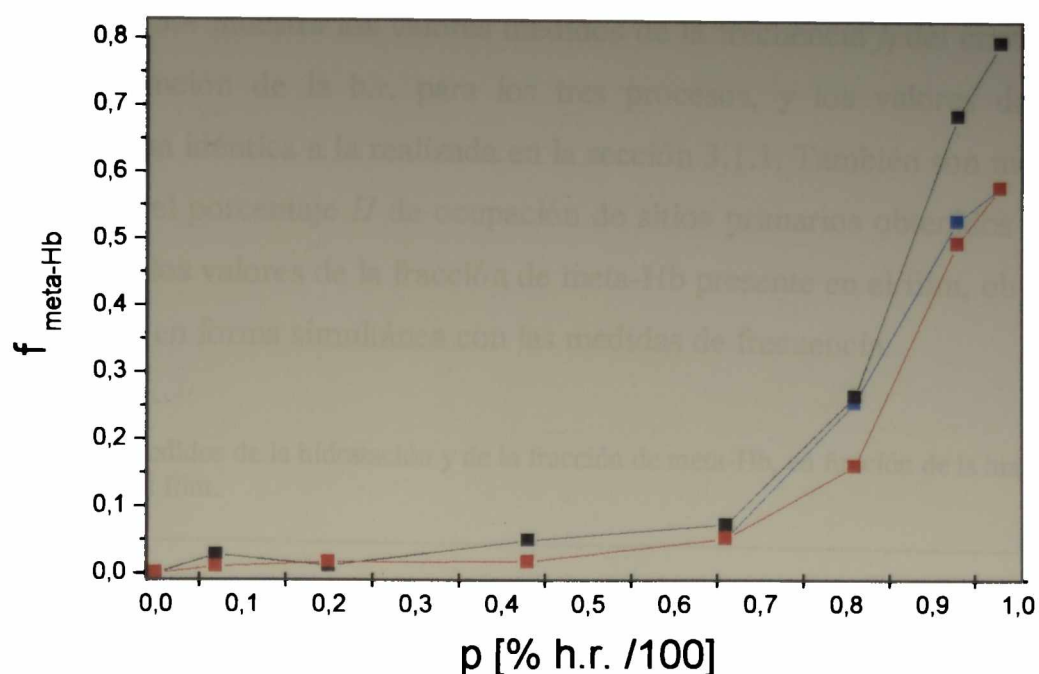


Figura 3.7 : Fracción de meta-Hb presente en el film, $f_{meta-Hb}$, en función de la humedad p para los procesos de desorción nativa (---■---), sorción luego del secado completo en P_2O_5 (---■---), y desorción luego del secado y rehidratación (---■---).

Puede observarse en la Figura 3.7 que cuando la proteína es completamente deshidratada en ambiente con P_2O_5 se convierte en un material distinto desde el punto de vista de la conversión de especies conformacionales. La proteína una vez deshidratada presenta el comportamiento de histéresis para la conversión. Este comportamiento es análogo al observado en la isoterma de sorción de agua por la proteína, mostrado en la Figura 3.5.

Los datos experimentales presentados en la Figura 3.7 muestran que para humedades menores a 66 % casi la totalidad de la proteína se encuentra en el estado hemicromo. A medida que la h.r. aumenta disminuye la cantidad de hemicromo y aumenta la fracción de meta-Hb. A 98 % h.r. aún existe hemicromo en el film, este resultado ya fue observado en el experimento de la sección 3.1.1. La fracción de meta-Hb para el film nativo en equilibrio con la humedad del 98 % corresponde a $f_{meta-Hb} = 0,80$, valor idéntico al obtenido en el experimento cinético de la sección 3.1.1; mientras que para el film previamente deshidratado en ambiente con P_2O_5 , la fracción de meta-Hb presente a 98 % h.r. es $f_{meta-Hb} = 0,58$. Estos valores indican que la deshidratación total de la meta-Hb produce formación irreversible de hemicromo, que no se reconvierte a meta-Hb luego de la rehidratación. Al final del experimento, la dilución del film en tampón fosfato 0,1 M + NaCl 0,1 M, pH7, arroja un valor de R igual a 1,18 que corresponde al 87 % de meta-Hb. Esta irreversibilidad no se observa cuando se deshidrata la muestra hasta 7 % de h.r.

La Tabla 3.4 muestra los valores medidos de la frecuencia f_f del cristal con el film de proteína en función de la h.r. para los tres procesos, y los valores de hidratación, calculados en forma idéntica a la realizada en la sección 3.1.1. También son mostrados en la tabla los valores del porcentaje Π de ocupación de sitios primarios obtenidos a partir de la ecuación (2.42), y los valores de la fracción de meta-Hb presente en el film, obtenidos de los espectros tomados en forma simultánea con las medidas de frecuencia.

Tabla 3.4 : Valores medidos de la hidratación y de la fracción de meta-Hb, en función de la humedad relativa a la que es equilibrado el film.

Tipo de Proceso: desorción nativa								
P	f_f [kHz]	$- \Delta f$ [kHz]	m [10^{-4} gr]	m_w [10^{-5} gr]	h [gr H ₂ O/gr Hb]	n_w [mol H ₂ O/mol Hb]	Π	$f_{meta-Hb}$
0,98	5986,930	12,236	1,9048	5,6431	0,4210	1510,7	99,12	0,801
0,93	5987,475	11,691	1,8199	4,7947	0,3577	1283,6	99,96	0,686
0,81	5988,437	10,729	1,6702	3,2971	0,2460	882,7	95,48	0,266
0,66	5988,931	10,235	1,5933	2,5281	0,1886	676,8	98,62	0,073
0,43	5989,409	9,757	1,5189	1,7840	0,1331	477,6	97,10	0,048
0,20	5989,710	9,456	1,4720	1,3154	0,0981	352,2	91,88	0,027
0,07	5990,012	9,154	1,4250	0,8453	0,0631	226,3	66,40	0,011
0	5990,555	8,611	1,3404	0	0	0	0	0
Tipo de Proceso: sorción previo secado								
P	f_f [kHz]	$- \Delta f$ [kHz]	m [10^{-4} gr]	m_w [10^{-5} gr]	h [gr H ₂ O/gr Hb]	n_w [mol H ₂ O/mol Hb]	Π	$f_{meta-Hb}$
0	5990,555	8,611	1,3404	0	0	0	0	0
0,07	5990,078	9,088	1,4147	0,7426	0,0554	198,8	68,90	0,010
0,20	5989,791	9,375	1,4594	1,1894	0,0887	318,4	97,74	0,016
0,43	5989,583	9,583	1,4918	1,5132	0,1129	405,1	95,98	0,017
0,66	5989,159	10,007	1,5578	2,1732	0,1621	581,8	97,10	0,052
0,81	5988,654	10,512	1,6364	2,9593	0,2208	792,2	96,02	0,160
0,93	5987,667	11,499	1,7900	4,4958	0,3354	1203,6	99,93	0,496
0,98	5987,148	12,018	1,8708	5,3037	0,3956	1419,9	98,60	0,580
Tipo de Proceso: desorción previo secado y rehidratación								
P	f_f [kHz]	$- \Delta f$ [kHz]	m [10^{-4} gr]	m_w [10^{-5} gr]	h [gr H ₂ O/gr Hb]	n_w [mol H ₂ O/mol Hb]	Π	$f_{meta-Hb}$
0,98	5987,148	12,018	1,8708	5,3037	0,3956	1419,9	98,15	0,580
0,93	5987,586	11,580	1,8027	4,6219	0,3448	1237,3	99,98	0,530
0,81	5988,574	10,592	1,6489	3,0838	0,2301	825,6	95,87	0,256
0,66	5989,091	10,075	1,5684	2,2790	0,1700	610,1	96,14	0,052
0,43	5989,509	9,657	1,5033	1,6283	0,1215	435,9	96,4	0,018
0,20	5989,742	9,424	1,4670	1,2656	0,0944	338,8	96,47	0,017
0,07	5990,042	9,124	1,4203	0,7986	0,0596	213,8	68,56	0,010
0,00	5990,555	8,611	1,3404	0	0	0	0	0

La Figura 3.8 muestra las curvas de equilibrio de meta-Hb/hemicromo en función del contenido de agua, construida a partir de los datos experimentales dados en la Tabla 3.4.

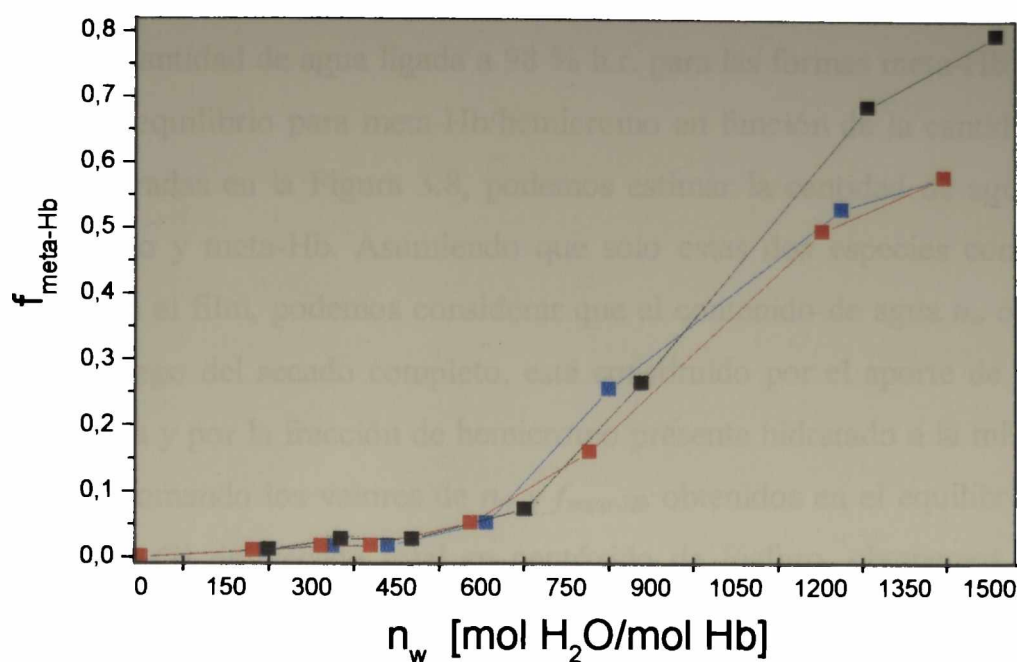


Figura 3.8 : Fracción de meta-Hb, $f_{\text{meta-Hb}}$, en función del contenido de agua, n_w , para los procesos de desorción nativa (···■···), sorción luego del secado completo en P₂O₅ (···■···), y desorción luego del secado y rehidratación (···■···).

En el gráfico de la Figura 3.8 se observa que para contenidos de agua menores que 600 mol H₂O/mol Hb ($h=0,17$ gr H₂O/gr Hb) casi la totalidad de la proteína presente en el film se encuentra en el estado hemicromo. Para contenidos de agua mayores que 600 mol H₂O/mol Hb, donde el porcentaje Π de sitios primarios ocupados comienza a tomar los valores altos correspondientes a la saturación, se observa conversión significativa de hemicromo para meta-Hb. Este valor de hidratación de 600 mol H₂O/mol Hb corresponde por lo tanto al valor crítico n_{wc} , abajo del cual el único estado conformacional estable es el hemicromo. El valor de hidratación a partir del cual sólo la especie meta-Hb está presente, lo que determinaría el valor de hidratación crítico superior n_{ws} necesario para la estabilización de la estructura normalmente observada en solución, no es posible obtenerlo de la gráfica. Solo podemos afirmar que este valor es mayor que 1510,7 mol H₂O/mol Hb para el film nativo. La Figura 3.8 muestra que la deshidratación total produce formación irreversible de hemicromo. Aún diluyendo el film al final del experimento en tampón fosfato 0,1 M + NaCl 0,1 M, pH7, la meta-Hb no recupera la estructura típica en solución. El hecho de que estas irreversibilidades no se observen cuando se deshidrata parcialmente el film en un ambiente

de 7 % h.r., sugiere que existe un valor crítico para el contenido de agua, $n_{wr} \approx 226$ mol H₂O/mol Hb, abajo del cual la proteína sufre cambios conformacionales irreversibles.

Los datos experimentales presentados en esta sección permiten hacer una estimación de la cantidad de agua ligada a 98 % h.r. para las formas meta-Hb y hemicromo. De las curvas de equilibrio para meta-Hb/hemicromo en función de la cantidad de agua de hidratación, mostradas en la Figura 3.8, podemos estimar la cantidad de agua ligada a las formas hemicromo y meta-Hb. Asumiendo que solo estas dos especies conformacionales están presentes en el film, podemos considerar que el contenido de agua n_w observado a 98 % h.r., antes y luego del secado completo, está constituido por el aporte de la fracción de meta-Hb hidratada y por la fracción de hemicromo presente hidratado a la misma humedad. De esta manera, tomando los valores de n_w y $f_{meta-Hb}$ obtenidos en el equilibrio a 98 % h.r. antes (1) y luego (2) del secado total en pentóxido de fósforo, obtenemos las siguientes ecuaciones

$$n_w^1 = n_w^{meta-Hb} f_{meta-Hb}^1 + n_w^{hemicromo} f_{hemicromo}^1 \quad (3.1a)$$

$$n_w^2 = n_w^{meta-Hb} f_{meta-Hb}^2 + n_w^{hemicromo} f_{hemicromo}^2 \quad (3.1b)$$

donde $n_w^{meta-Hb}$ corresponde a la hidratación de la especie meta-Hb a 98 % h.r., y $n_w^{hemicromo}$ a la hidratación de la especie hemicromo a la misma humedad de 98 %. De esta forma, reemplazando en las ecuaciones (3.1a) y (3.1b) por los datos experimentales de n_w^1 y n_w^2 dados en la Tabla 3.4, y haciendo la fracción de hemicromo igual a $f_{hemicromo}^i = 1 - f_{meta-Hb}^i$, con $i=1$ ó 2 , tenemos el siguiente sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas

$$1510,7 = 0,80n_w^{meta-Hb} + 0,20n_w^{hemicromo} \quad (3.2a)$$

$$1419,8 = 0,58n_w^{meta-Hb} + 0,42n_w^{hemicromo} \quad (3.2b)$$

de donde obtenemos $n_w^{meta-Hb} = 1593,3$ mol H₂O/mol Hb, y $n_w^{hemicromo} = 1180,2$ mol H₂O/mol Hb. De acuerdo a estas consideraciones, luego del secado total la muestra no recupera el número de aguas ligadas a 98 % h.r. debido a la formación irreversible de hemicromo, el que presenta una menor cantidad de agua ligada respecto a la forma meta-Hb.

3.1.3) Hidratación de meta-Mb

Las isotermas de hidratación para meta-Mb fueron estudiadas por Grigera & Mogilner (Grigera & Mogilner, 1982; Mogilner, 1989). Estos autores comienzan el experimento a alta humedad con la desorción del film de meta-Mb nativo y encuentran comportamientos de irreversibilidad luego del secado total, e histéresis, similares a nuestros

resultados para meta-Hb. Las isothermas de sorción de vapor de agua por meta-Mb permiten interpretar los espectros de RMN de un cristal de meta-Mb usando modelos de agua de intercambio (Grigera & Mascarenhas, 1978; Grigera, 1979; Grigera & Berendsen, 1979). Este tratamiento permite identificar el agua de los sitios primarios de sorción con el agua de hidratación observada por técnicas de difracción, además permite observar la formación de puentes de agua conectando distintos aminoácidos en la misma macromolécula. Estos puentes de agua actuarían como tensores estabilizando la estructura nativa (Grigera & Mogilner, 1982; Grigera, Blum, & Stanley).

Nuestros resultados del contenido de agua para el film preparado a partir de la muestra de meta-Mb descrita en la sección 2.1.3, en equilibrio con la humedad del 98 %, muestran que 486 mol H₂O / mol Hb corresponden a la meta-Mb nativa, mientras que 453 mol H₂O / mol Hb es el número de hidratación obtenido luego de rehidratar el film previamente secado en ambiente con P₂O₅. Estos valores de hidratación presentan un muy buen acuerdo con los obtenidos previamente por Grigera & Mogilner, y muestran que la cantidad de agua de hidratación de la meta-Mb, equilibrada a 98 % h.r., corresponde aproximadamente a la tercera parte de los valores medidos en meta-Hb, a la misma h.r..

Los cambios conformacionales producidos por la deshidratación de films de meta-Mb fueron estudiados mediante el análisis de los espectros de absorción (Colombo, 1988). Estos estudios muestran que al deshidratar la muestra hasta una humedad del 60 %, ocurre una transición conformacional de meta-Mb para hemicromo con una cinética que representa un proceso unimolecular simple; mientras que la deshidratación a humedades mas bajas produce una transición de meta-Mb para un nuevo estado conformacional distinto del hemicromo. La existencia de un tercer estado involucrado durante el proceso de desnaturalización de la Mb ha sido también observada cuando este es inducido por alta presión (Floriano & col., 1998), por urea en solución (Jennings & Wright, 1993), y durante la transición de meta-Mb para desoxi-Mb usando rayos X o por excitación de cloruro de rutenio con luz visible (Lamb & col., 1998).

3.2) Agua y función

La estructura funcional de las proteínas solubles es crucialmente dependiente de sus interacciones con el solvente acuoso. Cada reorganización estructural como las inducidas por la unión de ligantes en las proteínas alostéricas, unión de substratos, oligomerización, o

desnaturalización, es inexorablemente acompañada por la unión o liberación de agua de hidratación.

La contribución energética de la hidratación al equilibrio bioquímico, como una medida del número de moléculas de agua que participan en la reacción, puede ser determinada a través del corrimiento en la constante de equilibrio medida en una solución con actividad de agua a_w , la que es ajustada mediante la adición de solutos neutrales en la solución (Colombo & col., 1992). Esta afirmación es críticamente confirmada en esta sección mediante medidas de la masa de films de Hb durante la oxigenación, a 98 % h.r., usando la microbalanza de cuarzo. Asimismo, investigamos el efecto del Cl^- sobre la reacción, y la estabilización de nuevas estructuras en el proceso de oxigenación de la Hb.

3.2.1) *Medidas de la cantidad de agua de hidratación para desoxi y oxi-Hb en presencia y en ausencia de Cl^-*

La hidratación de films de Hb humana completamente oxigenada y desoxigenada es determinada a través de la microbalanza de cuarzo montada en la celda previamente descrita en la sección 2.2.3, que permite la determinación paralela del peso del film depositado en el cristal de cuarzo, y la saturación con el oxígeno a través del espectro en el rango visible de un film de Hb depositado en la lámina de vidrio óptico. Estos experimentos han sido llevados a cabo con Hb en presencia y ausencia de NaCl, puesto que recientemente ha sido mostrado mediante el método de estrés osmótico que la diferencia en la hidratación Δn_w entre la forma oxi y la forma desoxi-Hb cambia en 25 moléculas de agua para la Hb en ausencia de aniones (Colombo & Seixas, 1999), mientras que para la Hb en presencia de mas de 50 mM NaCl la diferencia de hidratación Δn_w es de 70 moléculas de agua (Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996).

Los films son preparados a partir de las muestras de oxi-Hb iónicas o isoiónicas descritas en la sección 2.1.1, esparciendo menos de 10 μ l de solución sobre la lámina de vidrio óptico y sobre una de las caras del cristal de cuarzo. La alta concentración de las muestras permite obviar los problemas de dimerización producidos durante la transición $T \rightleftharpoons R$ (Mills & col., 1976). Inmediatamente, para prevenir la oxidación, los films son colocados en el interior de la celda de medición conteniendo una solución saturada de K_2SO_4 que genera una humedad relativa del 98 % en el interior. Los films son primeramente equilibrados con una atmósfera inerte de N_2 , a 98 % de h.r., hasta que la proteína esté completamente desoxigenada y su contenido de agua equilibrado con la fase vapor. Este

equilibrio es caracterizado por la ausencia de cambios espectrales y de lectura de masa, determinada por la frecuencia del cristal con el film. El equilibrio del contenido de agua de los films con la humedad relativa del 98 % en una atmósfera de N_2 se logra luego de transcurridas dos horas de exposición, mientras que la desoxigenación total lleva un tiempo de dos horas para la muestra iónica y de cuatro horas para la muestra isoiónica, lo que indica que en esta última la forma oxi es mucho más estable.

Una vez equilibrado el film en la forma desoxi con la humedad del 98 %, se permite el acceso controlado de un muy débil flujo de aire a 98 % h.r. en el interior de la celda de medición. Los espectros en el rango 450-700 nm son tomados en función del tiempo de oxigenación simultáneamente con la lectura de frecuencia del cristal con el film de Hb, hasta que la proteína esté completamente oxigenada e hidratada. Luego de estas medidas, el film del cristal es completamente deshidratado durante mas de 12 horas en una atmósfera con P_2O_5 , de manera de obtener la masa de proteína seca.

La Figura 3.9 muestra los espectros en el rango 450-700 nm obtenidos en función del tiempo de oxigenación para el film de desoxi-Hb iónica equilibrado a 98 % h.r. en una atmósfera inerte de N_2 , cuando este es expuesto a una atmósfera aeróbica con 98 % de h.r.

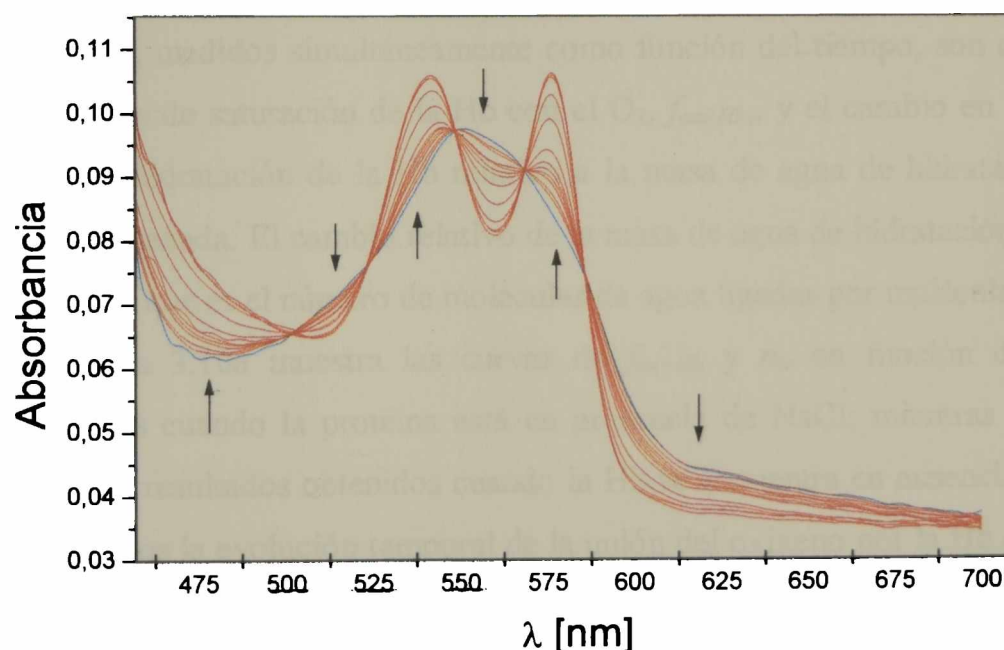


Figura 3.9: Espectros ópticos que representan la cinética de la unión del O_2 por el film de Hb en presencia de NaCl (muestra iónica), en una atmósfera de 98 % h.r.. Inicialmente el film es equilibrado con una atmósfera de N_2 , a 98 % h.r., durante mas de 2 horas, de manera de desoxigenar completamente el film y de equilibrar el contenido de agua en la proteína con el agua en la fase de vapor. El espectro en azul, característico de la desoxi-Hb, corresponde al tomado inmediatamente antes de la admisión de O_2 en la celda. Luego de la admisión de O_2 a 98 % h.r. en la celda, los espectros y la lectura de frecuencia del cristal de cuarzo son tomados en función del tiempo en forma simultánea, hasta que la proteína este completamente oxigenada. Puede observarse en los espectros la presencia de cinco puntos isobásticos en las longitudes de onda de 585, 569, 548, 522, y 505 nm, los cuales son característicos de la transición T→R.

El experimento realizado con la muestra de Hb isoiónica presenta una cinética de transición a la forma oxi más rápida que el de la muestra iónica. Los espectros ópticos del experimento con la muestra isoiónica poseen el mismo comportamiento que los de la muestra iónica descritos en la Figura 3.9, con los mismos puntos isosbéticos.

Los espectros de la Figura 3.9 muestran que el film de Hb, a 98 % h.r., es funcionalmente activo. Los cinco puntos isosbéticos en 585, 569, 548, 522, y 505 nm mostrados en la Figura 3.9 son característicos de la transición desoxi-Hb \rightarrow oxi-Hb. La existencia de estos puntos isosbéticos indican que no hay formación significativa de meta-Hb durante el tiempo en el que las medidas cinéticas son realizadas. La presencia de solo dos especies en el film, permite calcular, a través de los espectros, la razón de transición R mediante la ecuación (2.7), en función del tiempo. En el presente caso tomamos $\lambda_I = 576$ nm, y $\lambda_{PI} = 585$ nm, donde las absorbancias en estas longitudes de onda fueron medidas tomando como línea de base la absorbancia en 700 nm. La razón de transición en función del tiempo, $R = R(t)$, es usada para calcular, a partir de la ecuación (2.16), la evolución temporal de la fracción de oxi-Hb, $f_{\text{oxi-Hb}}$, presente durante el transcurso del proceso.

Los espectros ópticos y la lectura de la frecuencia de resonancia de la micro-balanza de cuarzo, medidos simultáneamente como función del tiempo, son utilizados para calcular la fracción de saturación de la Hb con el O_2 , $f_{\text{oxi-Hb}}$, y el cambio en la cantidad de masa de agua de hidratación de la Hb relativo a la masa de agua de hidratación de la Hb totalmente desoxigenada. El cambio relativo de la masa de agua de hidratación es expresado en términos de n_w , que es el número de moléculas de agua ligadas por molécula de Hb.

La Figura 3.10a muestra las curvas de $f_{\text{oxi-Hb}}$ y n_w en función del tiempo de transición medidas cuando la proteína está en presencia de NaCl; mientras que la Figura 3.10b muestra los resultados obtenidos cuando la Hb se encuentra en ausencia de NaCl. En ambos experimentos la evolución temporal de la unión del oxígeno por la Hb es coincidente con el incremento de la masa de la Hb. Puesto que el incremento en la masa de la proteína a medida que se une el O_2 es muy superior a la masa aportada por este, el excedente esta dado por la unión de agua. Esto demuestra que se produce una captación de agua durante la unión del oxígeno a la Hb.

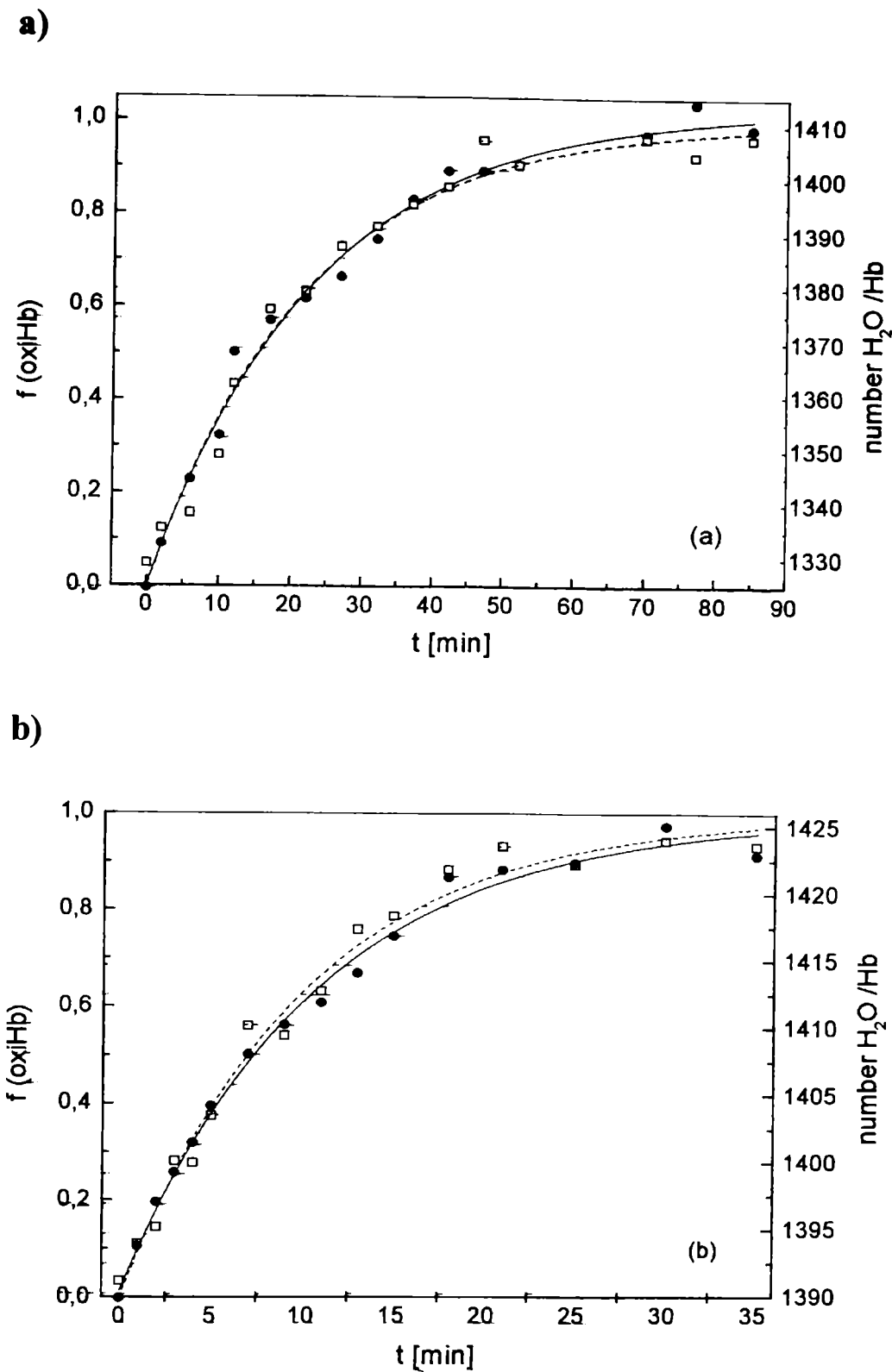


Figura 3.10: Cinética de la unión del oxígeno, $f_{\text{oxi-Hb}}$, y de la captación de agua, n_w , por los films de Hb expuestos a 98 % h.r., durante la transición desoxi \rightarrow oxi ; a) preparados a partir de una solución 7 mM Hb conteniendo 200 mM NaCl, pH 7, y b) preparados a partir de la solución sin NaCl. La fracción de saturación con el O_2 (\bullet) es mostrada en el eje de las ordenadas de la izquierda, mientras que la ganancia de agua de hidratación n_w (\square) producida durante la oxigenación es representada en el eje derecho. Las líneas que conectan los puntos experimentales (--- para $f_{\text{oxi-Hb}}$ y — para n_w) corresponden al mejor ajuste logrado con la función

$$y(t) = y(0) + \Delta y \left(1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_y} \right) \right)$$

lo que muestra que ambos procesos siguen una cinética de primer orden que representa una reacción unimolecular simple, cuyos parámetros están mostrados en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Valores de los parámetros ajustados para las cinéticas de unión del O₂ y captación de agua por el film de Hb, a 98 % h.r., durante la transición desoxi → oxi. Los datos cinéticos mostrados en la Figura 3.10 son ajustados usando la función que modela a la reacción de primer orden dada por la ecuación (2.24)

$$y(t) = y(0) + \Delta y \left(1 - \exp \left(- \frac{t}{\tau_y} \right) \right)$$

con $y = f_{\text{oxi-Hb}}$ ó n_w , y $\Delta y = y(t=\infty) - y(t=0)$, donde $y(t=0)$ e $y(t=\infty)$ representan respectivamente las cantidades medidas con el film equilibrado en una atmósfera de N₂ a 98 % h.r., y luego de la equilibración con aire a la misma humedad. La cantidad Δn_w es el incremento en la masa de agua de hidratación producida durante la transición de desoxi-Hb para oxi-Hb, y es expresada en términos de moles de agua por mol de Hb. Este cambio de masa contiene la contribución de cuatro moléculas de O₂ a la masa de la oxi-Hb, de manera que el cambio neto en la cantidad de agua de hidratación corresponde a $\delta n_w = \Delta n_w - 8$ moléculas de H₂O por molécula de Hb. τ_y es la constante de tiempo para el proceso y , y es dada en unidades de minutos.

Film de Hb	$\tau_{f_{\text{oxi-Hb}}}$	τ_{n_w}	$n_w^{t=0}$	δn_w
con NaCl	22,2 ± 2,0	23,4 ± 2,0	1327,2 ± 2,2	80,1 ± 2,6
sin NaCl	10,0 ± 1,0	10,7 ± 0,8	1391,4 ± 0,8	27,4 ± 1,0

En la Figura 3.10 y en la Tabla 3.5 puede observarse que para la Hb en ausencia de NaCl, la forma desoxi presenta una mayor cantidad de agua de hidratación comparada con la desoxi-Hb en presencia de NaCl: 1391,4 ± 0,8 mol H₂O por mol Hb contra 1327,2 ± 2,2 mol H₂O por mol Hb respectivamente. Mientras que el incremento en la cantidad de agua de hidratación producido durante la oxigenación es menor para la muestra en ausencia de sal: 27,4 ± 1,0 mol H₂O por mol Hb contra 80,1 ± 2,6 mol H₂O por mol Hb para la muestra en presencia de sal.

Las curvas que conectan los puntos experimentales en las Figuras 3.10a y 3.10b presentan solo una constante de tiempo, indicando que tanto la unión del oxígeno como la ganancia de agua de hidratación siguen una reacción de primer orden, que corresponde a un proceso unimolecular simple.

Para cada condición salina, las constantes de tiempo para los procesos de captación de O₂ y ganancia de agua de hidratación son las mismas (dentro de los errores experimentales), indicando que ambos procesos, captación de O₂ y ganancia de agua, ocurren simultáneamente. Estos procesos presentan una constante de tiempo menor para la muestra sin NaCl, mostrando que la afinidad por el oxígeno en esta muestra es mayor en comparación con la muestra con NaCl.

El hecho que las cinéticas de la unión del oxígeno y del agua sean de primer orden, indica la existencia de un mecanismo común que regula ambos procesos de unión; puesto que el oxígeno se une a los cuatro sitios de unión a través de un proceso cooperativo regulado por el equilibrio alostérico entre diferentes estructuras de la Hb, y dado que las moléculas de agua son ligadas para hidratar la nueva superficie proteica expuesta por la transición estructural reversible entre la Hb totalmente desoxigenada y la Hb totalmente

oxigenada. Este paralelismo es mucho más evidenciado por las curvas del número de moléculas de agua de hidratación, n_w , en función de $f_{\text{oxi-Hb}}$, mostradas en la Figura 3.11, las que demuestran que en ambas condiciones salinas la cantidad de agua de hidratación crece linealmente con la fracción de saturación del oxígeno.

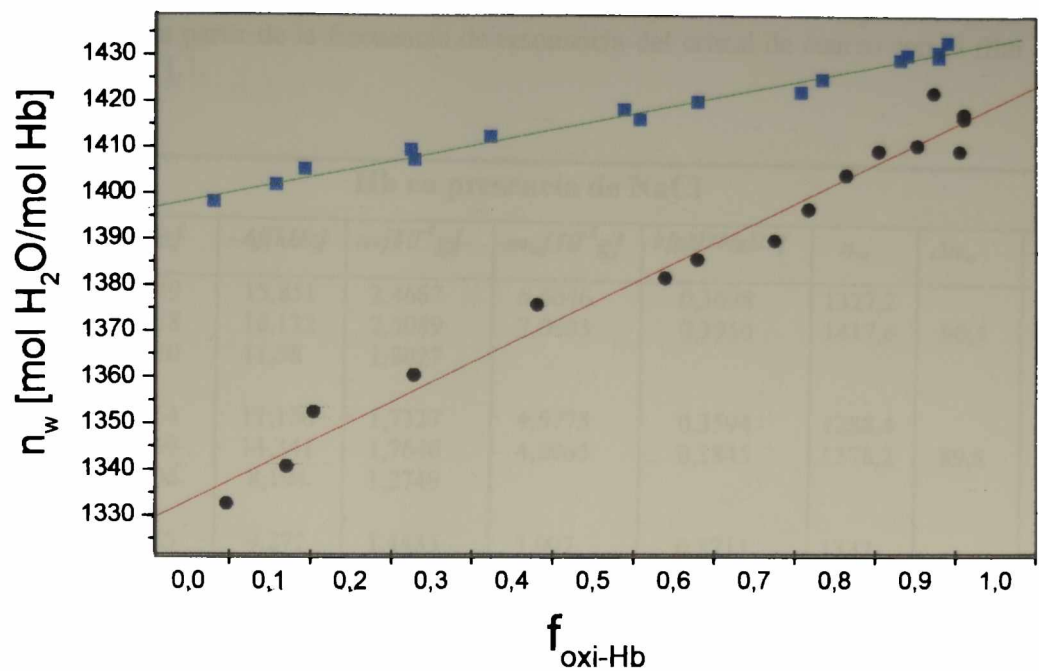


Figura 3.11: Cambio en la cantidad de agua de hidratación, n_w , debido al cambio en la fracción de saturación del O_2 por la Hb, $f_{\text{oxi-Hb}}$. Estas curvas son graficadas a partir de los datos de la Figura 3.10, para los films de Hb conteniendo NaCl (\bullet), y para los films de Hb en ausencia de NaCl (\blacksquare). Las líneas que conectan los puntos experimentales corresponden al mejor ajuste lineal, las pendientes de estas rectas corresponden, para cada condición salina, al incremento en la cantidad de agua de hidratación de la Hb, Δn_w , inducido por la unión del O_2 . Estas pendientes corresponden a $86,2 \pm 4,6$ mol H_2O por mol Hb ($r = 0,979$) para la muestra en presencia de NaCl, y a $34,7 \pm 1,4$ mol H_2O por mol Hb ($r = 0,987$) para la muestra en ausencia de NaCl; estos valores arrojan un cambio neto en la cantidad de agua de hidratación, $\delta n_w = \Delta n_w - 8$ mol H_2O por mol Hb, correspondiente a $78,2 \pm 4,6$ mol H_2O por mol Hb para la Hb para la muestra iónica, y a $26,7 \pm 1,4$ mol H_2O por mol Hb para la muestra isoiónica.

Las pendientes de las rectas en la Figura 3.11 determinan que $78,2 \pm 4,6$ moléculas de agua se ligan a cada tetramero de Hb, en presencia de NaCl, durante la transición desde el estado desoxi al estado completamente oxigenado; mientras que para la Hb en ausencia de NaCl el cambio en la hidratación durante la transición corresponde a $26,7 \pm 1,4$ moléculas de agua por molécula de Hb.

El hecho de que la muestra de Hb en ausencia de NaCl ligue una menor cantidad de agua de hidratación durante la transición desoxi→oxi indica la presencia de una nueva conformación alostérica de la forma desoxi, con una mayor afinidad por el oxígeno y con un número mayor de moléculas de agua ligadas, con respecto a la estructura canónica T de la desoxi-Hb con aniones ligados.

La Tabla 3.6 muestra los valores experimentales obtenidos en diferentes repeticiones del experimento, para la cantidad de agua ligada durante la transición desoxi →oxi en films de Hb con y sin NaCl, equilibrados con una humedad relativa del 98 %.

Tabla 3.6: Medidas directas de la masa de films de desoxi y oxi-Hb en presencia y en ausencia de NaCl, equilibrados con una atmósfera de 98 % h.r., para diferentes repeticiones del experimento. El cálculo de la cantidad de agua ligada a partir de la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo con el film es idéntico al descrito en la sección 3.1.1.

Hb en presencia de NaCl								
conformación	f [kHz]	$-\Delta f$ [kHz]	m [10^{-4} g]	m_w [10^{-5} g]	h [gH ₂ O/gHb]	n_w	Δn_w	$\delta n_w = \Delta n_w - \delta$
desoxi-Hb	5984,149	15,851	2,4667	6,6646	0,3698	1327,2		
oxi-Hb	5983,878	16,122	2,5089	7,0683	0,3950	1417,6	90,4	82,4
Hb seca	5988,420	11,58	1,8027					
desoxi-Hb	5988,864	11,136	1,7327	4,5775	0,3594	1288,4		
oxi-Hb	5988,659	11,341	1,7646	4,8965	0,3845	1378,2	89,8	81,8
Hb seca	5991,806	8,194	1,2749					
desoxi-Hb	5990,723	9,277	1,4435	3,907	0,3711	1332		
oxi-Hb	5990,558	9,442	1,4691	4,1683	0,3955	1419,2	87,2	79,2
desoxi-Hb	5990,751	9,249	1,4391	3,8635	0,3669	1315,3		
oxi-Hb	5990,054	9,946	1,4713	4,1855	0,3963	1422,2	106,9	98,9
Hb seca	5993,324	6,766	1,0528					
desoxi-Hb	5984,149	15,851	2,4569	6,6525	0,3713	1332,5		
oxi-Hb	5983,861	16,139	2,5016	7,0989	0,3962	1421,9	89,4	81,4
Hb seca	5988,441	11,559	1,7916					
desoxi-Hb	5993,906	6,094	0,9483	2,5814	0,3740	1342,2		
oxi-Hb	5993,779	6,221	0,9681	2,7790	0,4026	1444,9	102,7	94,7
Hb seca	5995,565	4,435	0,6902					
Valores medios:								
desoxi-Hb					0,3688	1322,9		
oxi-Hb					0,3950	1417,3	94,4	86,4

Hb en ausencia de NaCl								
conformación	f [kHz]	$-\Delta f$ [kHz]	m [10^{-4} g]	m_w [10^{-5} g]	h [gH ₂ O/gHb]	n_w	Δn_w	$\delta n_w = \Delta n_w - \delta$
desoxi-Hb	5990,911	9,089	1,4141	3,9643	0,3895	1397,9		
oxi-Hb	5990,847	9,153	1,4241	4,0639	0,3993	1433	35,1	27,1
Hb seca	5993,459	6,541	1,0177					
desoxi-Hb	5986,167	13,833	2,1441	6,0651	0,3944	1415,6		
oxi-Hb	5986,075	13,925	2,1584	6,2077	0,4037	1448,1	32,5	24,5
Hb seca	5990,080	9,92	1,5376					
Valores medios:								
desoxi-Hb					0,3920	1406,7		
oxi-Hb					0,4015	1440,5	33,8	25,8

Al finalizar cada experimento de oxigenación, los films depositados sobre la lámina de vidrio óptico y sobre un segundo cristal de cuarzo auxiliar, son rápidamente disueltos en

tampón fosfato 0,1 M + NaCl 0,1 M, pH 7. Ambos films disueltos arrojan un contenido idéntico de meta-Hb, este contenido varía para cada experimento entre 10 y 20 %. Esto prueba que los films depositados sobre el cristal de cuarzo y sobre la lámina de vidrio óptico se encuentran en idénticas condiciones durante el experimento. El film de Hb depositado sobre el cristal de cuarzo principal, sobre el que tenemos lectura de frecuencia, es deshidratado completamente en una atmósfera con P_2O_5 durante mas de 12 horas, de manera de obtener la masa de proteína seca.

Estas mediciones directas del cambio de hidratación producido durante la oxigenación de la Hb, en presencia y en ausencia de NaCl, están, dentro de los errores experimentales, en concordancia con los valores determinados en solución mediante el método de estrés osmótico (Colombo & col., 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996; Colombo & Seixas, 1999).

3.2.2) Medidas de la cantidad de agua de hidratación para desoxi y oxi-Mb

La hidratación de films de mioglobina completamente desoxigenada y oxigenada es determinada a través de la microbalanza de cuarzo, en forma similar a la realizada para la Hb, descrita en la sección anterior. Puesto que la desoxi-Mb obtenida por reducción con ditionito es muy inestable, preparamos los films en ambiente de N_2 humidificado, de manera de prevenir la oxidación.

Para este experimento, los films de Mb son preparados a partir de la muestra de desoxi-Mb, descrita en la sección 2.1.4. El preparado de los films de desoxi-Mb es realizado en el interior de la campana, en ambiente anaeróbico, esparciendo menos de 10 μ l de la muestra sobre la lámina de vidrio óptico y sobre una de las caras del cristal de cuarzo. Inmediatamente, siempre en el interior de la campana con N_2 humidificado, los films son colocados en el interior de la celda de medición, la que contiene una solución saturada de K_2SO_4 que genera una humedad relativa del 98 %. La celda de medición es cerrada y luego transportada al espectrofotómetro, y conectada al frecuencímetro.

Los films de desoxi-Mb son equilibrados con una atmósfera inerte de N_2 , a 98 % h.r., durante mas de tres horas. El equilibrio es caracterizado por la ausencia de cambios en la lectura de frecuencia del cristal, que determina la cantidad de agua ligada al film. Durante estas tres horas, no se producen cambios espectrales puesto que el film ha permanecido en la forma desoxi.

Una vez equilibrado el film de Mb en la forma desoxi con la humedad del 98 %, se permite el acceso controlado de un muy débil flujo de aire a 98 % h.r. en el interior de la

celda de medición. Los espectros en el rango 450-700 nm son tomados en función del tiempo de oxigenación simultáneamente con la lectura frecuencia, hasta que la proteína esté completamente oxigenada. Luego de estas medidas, el film del cristal es deshidratado durante mas de 12 horas en una atmósfera de P_2O_5 , de manera de obtener la masa de proteína seca.

La Figura 3.12 muestra los espectros obtenidos en función del tiempo de oxigenación, para el film de Mb inicialmente equilibrado en una atmósfera inerte de N_2 a 98 % h.r., expuesto a una atmósfera aeróbica a 98 % h.r..

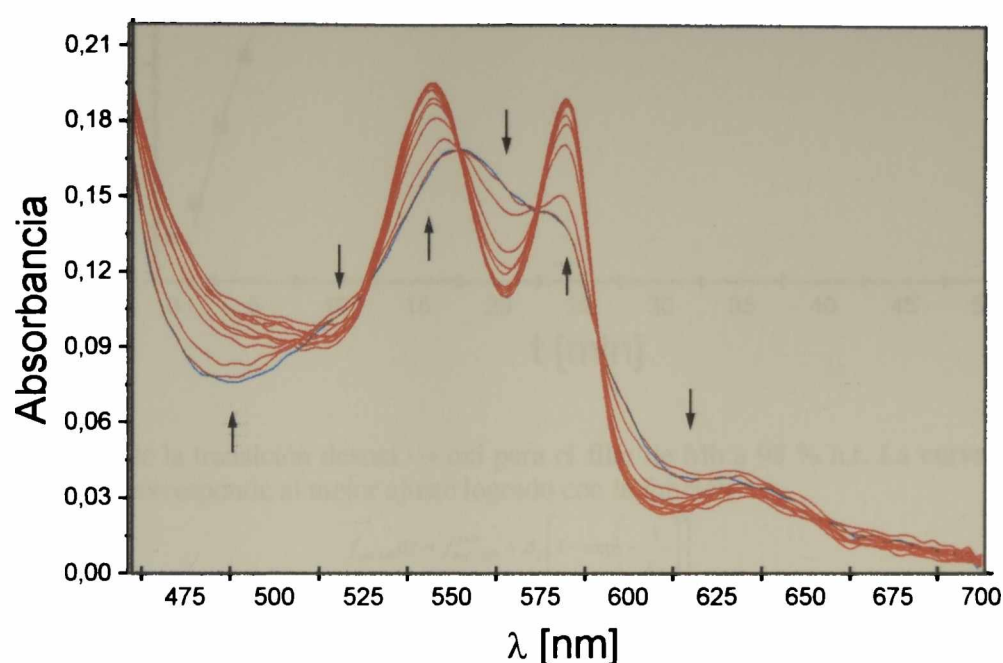


Figura 3.12: Espectros ópticos que representan la cinética de la unión del O_2 a la Mb. Inicialmente el film es equilibrado en una atmósfera anaeróbica, a 98 % h.r., durante mas de tres horas, de manera de equilibrar el contenido de agua del film de Mb en la forma desoxi con el agua en la fase vapor. Luego de la admisión de oxígeno a 98 % h.r. en la celda, los espectros y la lectura de frecuencia son tomados, simultáneamente, hasta que la proteína esté completamente oxigenada. El espectro representado en azul, característico de la desoxi-Mb, corresponde al tomado inmediatamente antes de la admisión de oxígeno en la celda, las flechas indican la dirección de los cambios espectrales producidos durante la oxigenación. Puede observarse en los espectros la presencia de 5 puntos isosbéticos en 508, 526, 552, 573, y 591nm, los cuales son característicos de la transición desoxi-Mb \rightarrow oxy-Mb (Bowen, 1949).

Los cinco puntos isosbéticos que presentan los espectros de la Figura 3.12 indican que no hay formación significativa de meta-Mb durante el tiempo en que estas medidas cinéticas son realizadas, y que la transición puede considerarse entre solo dos especies: desoxi y oxy-Mb. Esto nos permite calcular, a través de los espectros, la razón de transición R mediante la ecuación (2.7), en función del tiempo. En el presente caso tomamos $\lambda_I = 544$ nm, y $\lambda_{PI} = 591$ nm, donde las absorbancias en estas longitudes de onda fueron medidas tomando como línea de base la absorbancia a 700 nm. La razón de transición en función del

tiempo, $R = R(t)$, es usada para calcular, a partir de la ecuación (2.16), la evolución temporal de la fracción de oxi-Mb, $f_{\text{oxi-Mb}}$, durante el transcurso del proceso.

La Figura 3.13 muestra la curva de $f_{\text{oxi-Mb}}$ en función del tiempo de transición.

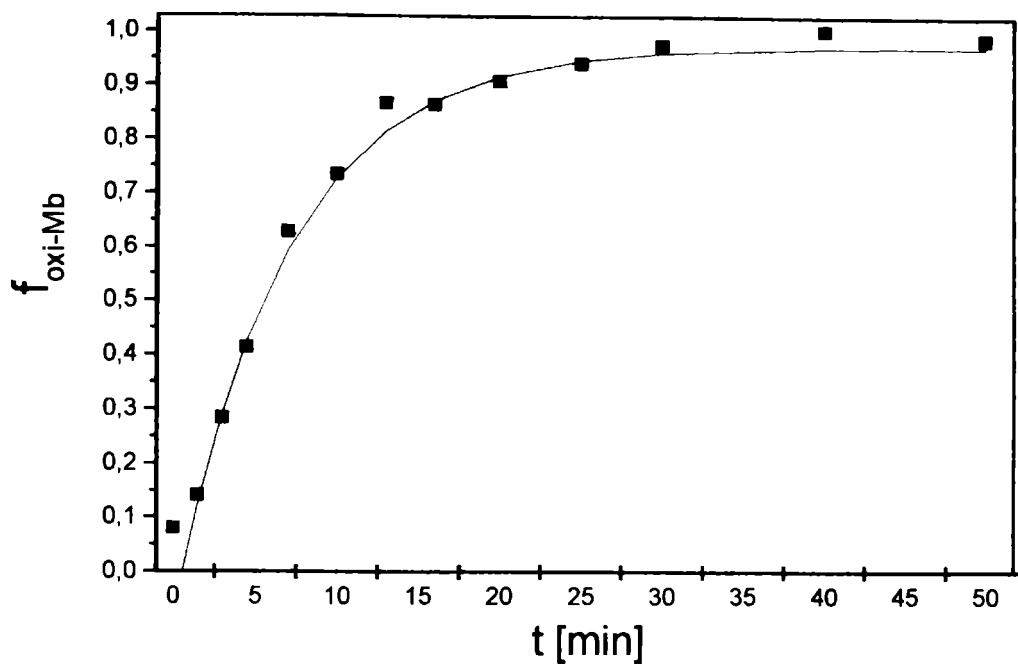


Figura 3.13: Cinética de la transición desoxi → oxi para el film de Mb a 98 % h.r. La curva que conecta los puntos experimentales corresponde al mejor ajuste logrado con la función

$$f_{\text{oxi-Mb}}(t) = f_{\text{oxi-Mb}}^{t=0} + \Delta_f \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \right)$$

que caracteriza un proceso de primer orden que representa una reacción unimolecular simple, con una constante de tiempo $\tau_f = 6,8 \pm 0,2$ min.

La curva que modela la cinética de la reacción mostrada en la Figura 3.13, presenta una constante de tiempo $\tau_f = 6,8 \pm 0,2$ min, esta es menor que la constante de tiempo, para la misma reacción, de las hemoglobinas con y sin NaCl, lo que muestra que la Mb monomérica posee una mayor afinidad por el O₂ que la Hb tetramérica.

Las medidas de frecuencia del cristal de cuarzo con el film, tomadas simultáneamente con los espectros ópticos, no presentan cambios durante la transición de desoxi-Mb para oxi-Mb. Esto implica que no se producen variaciones en el contenido de agua durante la oxigenación del film de Mb. El valor de hidratación obtenido mediante la microbalanza de cuarzo para el film de desoxi y oxi-Mb, a 98 % h.r, corresponde a $h = 0,483$ gr H₂O / gr Mb, ó $n_w = 477$ mol H₂O / mol Mb, que es aproximadamente igual a una tercera parte del valor obtenido para Hb en la misma humedad.

La no variación en la cantidad de agua de hidratación durante la oxigenación de la Mb, indica que en esta proteína monomérica el agua no esta involucrada como activador de

la transición. Caso contrario es lo que ocurre con la Hb tetramérica, donde el agua actúa como activador alostérico heterotrópico, ya que es incorporada durante la oxigenación. Puesto que la Mb no es una proteína alostérica, el hecho de que no se observen cambios en el contenido de agua durante la oxigenación constituye un control de la técnica experimental.

4- Conclusiones

4.1) Discusiones

En el presente trabajo se ha desarrollado un método experimental que permite determinar simultáneamente el contenido de agua y la conformación asociada en films de proteínas. Con este método hemos investigado el rol del agua de hidratación en la estructura y función de la Hb.

De esta manera encaramos el problema del agua involucrada en la estructura mediante el estudio de la cinética y el equilibrio de meta-Hb/hemicromo, inducidos por la alteración en la cantidad de agua de hidratación; como así también el problema del agua involucrada en la función a través del estudio de la contribución del agua de hidratación en la oxigenación de films de hemoglobina en equilibrio con una atmósfera a 98 % h.r..

4.1.1) *Agua y estructura*

Los términos hemicromo y hemocromo han sido usados en la literatura para designar a aquellos estados derivados de Hb y Mb con características espectrales similares a los de hemocromógenos oxidados y reducidos respectivamente. Estos hemocromógenos son obtenidos a partir de la unión de bases nitrogenadas en la quinta y sexta posición de coordinación del hierro en heminas oxidados y reducidos.

Los primeros estudios sobre deshidratación de Hb realizados por absorción óptica en el rango visible propusieron, basándose en las similitudes descriptas, que bajo deshidratación la sexta posición de coordinación del hierro del hemo sería ocupada por un grupo nitrogenado perteneciente a la globina (Keilin & Hartree, 1952).

Los hemicromos también han sido estudiados por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (Iizuka & Kotani, 1969; Rachmilewitz & col., 1971; Rachmilewitz, 1974; Peisach & col., 1975; Van Leeuwen & col., 1981); hemicromos y hemocromos fueron también estudiados por espectroscopia Mossbauer y por susceptibilidad magnética (Caughey & col., 1966; Papaefthymiou & col., 1975), además de los estudios por espectroscopia óptica (Haurowitz, 1951; Keilin & Hartree, 1952; Maricic & col., 1964; Bohm & Abaturon, 1977; Alter, 1983; Colombo, 1988; Colombo & Sanchez, 1990). Por otra parte, la formación de hemicromos y hemocromos es inducida por otros factores que no son la deshidratación, tales como la adición de bases nitrogenadas al hierro del hemo (Rachmilewitz, 1974), la desnaturalización ácida (Zipp & Kauzmann, 1973) y básica (Rachmilewitz, 1974), la disolución de proteína en cosolventes orgánicos (Bucher & Brown, 1971), el congelamiento de meta-Hb (Caughey & col., 1966; Iizuka & Kotani, 1969), la aplicación de altas presiones a la proteína (Zipp & Kauzmann, 1973; Ogunmola & col., 1977), espontáneamente en subunidades aisladas de meta-Hb (Ogunmola & col., 1977), en la destrucción de la Hb *in vivo* que lleva a la formación de los llamados cuerpos de Heinz (Rachmilewitz, 1974). Una buena parte de estos estudios muestran evidencias que ratifican la proposición inicial de Keilin & Hartree. Los estudios de rayos X de meta-Mb (Kendrew, 1961; 1963) revelaron que, debido a su proximidad con la posición ligante disponible en el hierro del hemo, el grupo nitrogenado endógeno a la globina, que se liga al hierro para formar hemi o hemocromo, es el imidazol de la histidina E7. De manera que los estados hemi y hemocromo presentan dos histidinas ligadas al hierro del hemo, por lo que el término *bis-his* a sido también utilizado en la literatura para denominar a estos derivados.

A pesar del hecho que la histidina E7 se encuentre próxima al átomo de hierro del hemo, su unión a éste requiere de algún reacomodo estructural de la proteína. El átomo de la histidina que se liga al hierro en las especies hemi y hemocromo es el nitrógeno, en forma similar a la unión de la histidina F8, que ocupa la quinta posición de coordinación de este ión en todas las especies de Hb y Mb. Por lo tanto, la unión de la histidina E7 al hierro del hemo requiere de algún movimiento de este aminoácido en la dirección del hemo, puesto que la distancia cristalográfica entre el nitrógeno de la histidina E7 y el plano del hemo en la meta-Hb es de 3,8 Å (Antonini & Brunori, 1971), mientras que las distancias para la unión del hierro están generalmente entorno a los 2 Å (Antonini & Brunori, 1971).

Los cambios espectrales producidos durante el proceso de formación de hemicromo fueron originalmente observados por Keilin & Hartree. Estos autores atribuían que la retirada del agua coordinada al hierro del hemo era la responsable de la formación de

hemicromo (Keilin & Hartree, 1952). Esta interpretación se basaba en parte en un trabajo publicado un año antes, en el que se mostraba que la deshidratación de la desoxi-Hb forma hemocromo, que es el hemicromo reducido, y que proponía, con base a este resultado, que la Hb en su estado desoxi tenía una molécula de agua coordinada al hierro del hemo (Haurowitz, 1951). Para consolidar esta hipótesis Keilin y Hartree mostraron también que la deshidratación de oxi-Hb a baja presión, en ambiente con P_2O_5 , no forma hemicromo. Esto les permitió argumentar que la deshidratación/rehidratación equivalía a una reacción de liberación/unión de una molécula de agua al hierro del hemo, con el equilibrio desplazado para el hierro anhidro con la disminución de la actividad del agua. La confirmación directa del agua ligada al hierro del hemo en el derivado meta fue obtenida con la resolución de la estructura de la meta-Mb (Kendrew, 1961; 1963). La hipótesis de que también en la forma desoxi hay una molécula de agua ligada al hierro fue descartada cuando los análisis de difracción de rayos X mostraron que en este derivado la sexta posición de coordinación del hierro se encuentra vacante (Nobbs, Watson, & Kendrew, 1966). Estos resultados de difracción de rayos X para la desoxi-Mb son contrarios a la hipótesis de que la transición que ocurre en la deshidratación de la forma desoxi para la forma hemocromo es debida a la retirada del agua ligada al hierro. Sin embargo, la hipótesis de que la retirada del agua ligada al hierro en la forma meta-Hb es la responsable de la formación de hemicromo parece persistir. Perutz & col., discutiendo resultados de la literatura, particularmente los referidos a la formación de hemicromo inducido por congelamiento de meta-Hb, hace uso de esta hipótesis (Perutz & col., 1974).

Los resultados obtenidos por Colombo sobre formación de los estados *bis-his* mediante deshidratación difieren de la hipótesis de que la retirada del agua ligada al hierro es la responsable de la formación de hemicromo. Estos estudios indican que la formación de hemicromo a partir de meta-Hb o de meta-Mb no es consecuencia directa de la retirada del agua ligada al hierro, pero sí es debido a la deshidratación de la globina (Colombo, 1988; Colombo & Sanches, 1990). En estas condiciones, la deshidratación induciría un nuevo estado estructural de la proteína en el cual el nitrógeno del imidazol de la histidina E7 se encuentra estéricamente disponible para unirse al hierro, pudiendo competir en términos de afinidad con el ligante unido al hierro en el estado hidratado de la proteína.

La hipótesis formulada por Colombo se basa en varias evidencias experimentales. Una de ellas es que el hemocromo se forma a partir de la deshidratación de la forma desoxi en ambiente anaeróbico a pesar de que no hay una molécula de agua ligada al hierro en la proteína hidratada. Otra evidencia mostrada por Colombo es que la deshidratación de la oxi-

hemicromo (Keilin & Hartree, 1952). Esta interpretación se basaba en parte en un trabajo publicado un año antes, en el que se mostraba que la deshidratación de la desoxi-Hb forma hemocromo, que es el hemicromo reducido, y que proponía, con base a este resultado, que la Hb en su estado desoxi tenía una molécula de agua coordinada al hierro del hemo (Haurowitz, 1951). Para consolidar esta hipótesis Keilin y Hartree mostraron también que la deshidratación de oxi-Hb a baja presión, en ambiente con P_2O_5 , no forma hemicromo. Esto les permitió argumentar que la deshidratación/rehidratación equivalía a una reacción de liberación/unión de una molécula de agua al hierro del hemo, con el equilibrio desplazado para el hierro anhidro con la disminución de la actividad del agua. La confirmación directa del agua ligada al hierro del hemo en el derivado meta fue obtenida con la resolución de la estructura de la meta-Mb (Kendrew, 1961; 1963). La hipótesis de que también en la forma desoxi hay una molécula de agua ligada al hierro fue descartada cuando los análisis de difracción de rayos X mostraron que en este derivado la sexta posición de coordinación del hierro se encuentra vacante (Nobbs, Watson, & Kendrew, 1966). Estos resultados de difracción de rayos X para la desoxi-Mb son contrarios a la hipótesis de que la transición que ocurre en la deshidratación de la forma desoxi para la forma hemocromo es debida a la retirada del agua ligada al hierro. Sin embargo, la hipótesis de que la retirada del agua ligada al hierro en la forma meta-Hb es la responsable de la formación de hemicromo parece persistir. Perutz & col., discutiendo resultados de la literatura, particularmente los referidos a la formación de hemicromo inducido por congelamiento de meta-Hb, hace uso de esta hipótesis (Perutz & col., 1974).

Los resultados obtenidos por Colombo sobre formación de los estados *bis-his* mediante deshidratación difieren de la hipótesis de que la retirada del agua ligada al hierro es la responsable de la formación de hemicromo. Estos estudios indican que la formación de hemicromo a partir de meta-Hb o de meta-Mb no es consecuencia directa de la retirada del agua ligada al hierro, pero sí es debido a la deshidratación de la globina (Colombo, 1988; Colombo & Sanches, 1990). En estas condiciones, la deshidratación induciría un nuevo estado estructural de la proteína en el cual el nitrógeno del imidazol de la histidina E7 se encuentra estéricamente disponible para unirse al hierro, pudiendo competir en términos de afinidad con el ligante unido al hierro en el estado hidratado de la proteína.

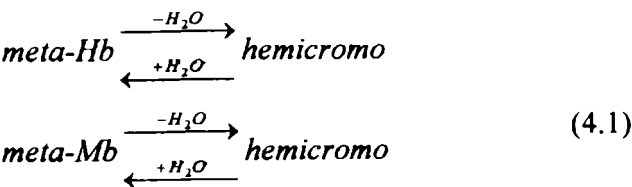
La hipótesis formulada por Colombo se basa en varias evidencias experimentales. Una de ellas es que el hemocromo se forma a partir de la deshidratación de la forma desoxi en ambiente anaeróbico a pesar de que no hay una molécula de agua ligada al hierro en la proteína hidratada. Otra evidencia mostrada por Colombo es que la deshidratación de la oxi-

Hb en ambiente aeróbico con P₂O₅ produce formación de hemicromo. En este caso, la sexta posición de coordinación del hierro que está ocupada inicialmente por O₂, sufre oxidación y cambio de ligante en la deshidratación. Según la hipótesis de que el hemicromo se forma por la retirada del agua unida al hierro, su obtención a partir del estado oxi requeriría la formación del intermediario meta-Hb en el proceso de deshidratación de la oxi-Hb, posibilidad que se ve muy reducida por la presencia de cuatro puntos isobésticos en los espectros ópticos obtenidos durante el proceso, característicos de una transición entre dos estados, y por la ausencia de formación de meta-Hb indicada por el análisis espectral (Colombo, 1988). De esta forma, Colombo concluye que no hay formación de meta-Hb en la deshidratación del derivado oxi-Hb, y que el O₂ es sustituido (antes, durante, o después de la oxidación del hierro) por el nitrógeno del imidazol, que se encuentra disponible para la unión al hierro debido al nuevo estado estructural de la proteína inducido por la retirada del agua de hidratación de la globina.

La diferencia en los resultados obtenidos por Colombo con los obtenidos por Keilin & Hartree se debe fundamentalmente al procedimiento de preparación de los films. Keilin & Hartree no observaron formación de hemicromo a partir de la deshidratación de oxi-Hb debido a que en el experimento los films son deshidratados muy rápidamente en ambiente de alto vacío conteniendo polvo de pentóxido de fósforo. De esta manera, la muy baja presión de O₂ y la alta velocidad del proceso de deshidratación impide la oxidación del hierro necesaria para la formación de hemicromo.

Las evidencias relatadas permitieron formular la hipótesis de que el evento molecular responsable de la formación de los estados *bis-his* es la deshidratación de la globina, la que produce la estabilización de un nuevo estado conformacional proteico, caracterizado por un arreglo estereoquímico en la región del hemo que permite la unión del nitrógeno del imidazol de la histidina E7 al hierro (Colombo, 1988).

El panorama presentado hasta aquí sugiere que el equilibrio entre las especies meta y hemicromo puede representarse de acuerdo a la expresión



donde el equilibrio se encuentra desplazado hacia la derecha con la disminución de la hidratación, y hacia la izquierda con el aumento de la hidratación.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos sobre la cinética de reconversión de hemicromo en meta-Hb inducida por la rehidratación del film, representados en las Figuras 3.2 y 3.3, muestran que el proceso de sorción de agua por el film es mas lento que el proceso de reconversión de hemicromo a meta-Hb. Ambos procesos son bifásicos, es decir que cada proceso presenta dos constantes de tiempo. Este comportamiento bifásico también fue observado previamente por Colombo durante el proceso inverso, es decir durante la conversión de meta-Hb en hemicromo (Colombo, 1988; Colombo & Sanches, 1990); sin embargo en estos trabajos no se realiza una determinación *in situ* de la sorción de agua por el film durante el proceso.

El comportamiento bifásico, observado en la cinética de nuestros estudios sobre reconversión de hemicromo en meta-Hb durante la rehidratación del film, es típico de dos situaciones. O indica la existencia de un intermediario en el proceso, no previsto en las expresiones (4.1); o indica la existencia de dos poblaciones estructuralmente distintas de meta-Hb, con idénticas propiedades espectrales pero con distintas velocidades de transición.

La presencia de 4 puntos isobésticos en los espectros ópticos, registrados en nuestros experimentos durante el proceso de rehidratación del film de meta-Hb (ver Figura 3.1), sugiere la existencia de solamente dos especies conformacionales. Pero la existencia de estos puntos isobésticos es insuficiente para garantizar la existencia de solo dos especies en la transición.

Un test para la existencia de intermediarios en la transición meta-Hb \rightleftharpoons hemicromo puede realizarse investigando esta transición en Mb. La Mb es una proteína monomérica que no está sujeta a interacciones intercadenas, mientras que la Hb es un tetrámero formado por dos tipos distintos de cadena, α y β (Antonini & Brunori, 1971). La formación del tetrámero rompe la homogeneidad estructural existente en la Mb, además de dar origen a las interacciones intersubunidades entre las cadenas que forman la Hb. De esta manera, si el comportamiento bifásico en la transición meta-Hb \rightleftharpoons hemicromo es determinado por la formación de intermediarios entre hemicromo y meta-Hb, y no por su heterogeneidad estructural, es de esperar que la Mb también presente un comportamiento bifásico. Esto no es lo que se observa en la transición meta-Mb \rightleftharpoons hemicromo, donde ocurre una cinética simple de transición entre dos estados sin intermediarios aparentes (Colombo, 1988). De acuerdo a este resultado, puede proponerse que el comportamiento bifásico observado durante la rehidratación del film, que induce la reconversión de hemicromo en meta-Hb, no es debido a la formación de intermediarios, sino a la existencia de dos poblaciones

cinéticamente distintas de meta-Hb originadas a partir de la heterogeneidad de las cadenas polipeptídicas y/o por algún tipo de interacción entre ellas.

Una suposición inmediata es considerar que el origen de las dos poblaciones cinéticamente distintas se encuentra en las cadenas α y β de la Hb. De esta manera, cada constante de velocidad medida es debida a las diferencias estructurales existentes entre ellas, las que otorgarían diferentes velocidades para la transición. Algunas evidencias a favor de esta interpretación son encontradas en la literatura en estudios en los cuales la formación de hemicromo por meta-Hb es inducida por otros factores que no son necesariamente deshidratación. Rachmilewitz & col., en un trabajo realizado en 1971, observaron que la velocidad de conversión espontánea a hemicromo de las cadenas α aisladas, en el estado férrico, es cerca de 20 veces más rápida que para las cadenas β aisladas, también en estado férrico; estos estudios muestran además que ambas cinéticas son simples. En otro trabajo realizado sobre estabilidad de las cadenas aisladas de meta-Hb en condiciones especiales de solvente, se observa que la muestra consistente en cadenas β presenta una mayor cantidad de estructura bis-his comparada con la muestra de cadenas α (Banerjee & Cassoly, 1969). Finalmente, análisis de la estructura de la bolsa hidrofóbica de las cadenas de meta-Hb permiten observar que existe una mayor proximidad del residuo valina E11 al agua ligada al hierro en cadenas β , comparada con las cadenas α (Takano, 1977; Ladner & col., 1977). Este contacto no polar tiene una importante influencia sobre los aspectos cinéticos de reacciones del hemo con ligantes (Edsall & col., 1983). La diferencia estructural en el entorno de la valina E11 probablemente expliquen porque en la estructura cuaternaria las cadenas β son más fácilmente reducidas que las cadenas α (Ladner & col., 1977). Estas son evidencias que permiten suponer que las dos poblaciones diferentes detectadas en las cinéticas de la transición estructural de hemicromo para meta-Hb, y de la sorción de agua, sean constituidas por las cadenas α y β de la Hb. Sin embargo, discutiendo resultados de la literatura donde se observa que la forma hemicromo es mucho mas estable en las cadenas aisladas que en el tetramero, Colombo sugiere que el origen del comportamiento bifásico puede deberse tanto a la distinción estructural entre las cadenas α y β como a las interacciones intersubunidades (Colombo, 1988).

Las curvas cinéticas obtenidas en nuestro trabajo para los experimentos de rehidratación del film de meta-Hb son bifásicas, tanto para la fracción de meta-Hb reconvertida como para la cantidad de agua sorbida por el film. Ambas cinéticas presentan dos constantes de tiempo (ver Tabla 3.2) que representan dos procesos, uno rápido y otro lento. Una constante de tiempo alta significa una baja velocidad del proceso. Las constantes

de tiempo en el proceso de sorción de agua son mayores que en el proceso de reconversión de hemicromo en meta-Hb, lo que indica que el proceso de la reconversión de hemicromo en meta-Hb es más rápido que la sorción de agua por el film. Por otra parte, la razón entre la constante de tiempo largo τ_{y1} y la constante de tiempo corto τ_{y2} para la reconversión de hemicromo en meta-Hb toma un valor muy similar al obtenido en la razón temporal para la sorción de agua (ver Tabla 3.2). Según estos resultados una población reacciona aproximadamente 11-14 veces más rápidamente que la otra, esto ocurre tanto para la reconversión de una especie en otra como para la captación de agua. Este resultado presenta cierto acuerdo con lo observado en 1971 por Rachmilewitz & col., y es favorable a la interpretación de que las dos poblaciones observadas en la cinética estén formadas por las cadenas α y β de la Hb.

Por otra parte, las velocidades de reacción están íntimamente correlacionadas con las propiedades dinámicas del sistema, de manera que la flexibilidad estructural de las proteínas es fundamental para la ocurrencia de reacciones en biomoléculas, ya que casi siempre estas reacciones inducen e involucran cambios conformacionales entre los estados inicial y final de la reacción (Colombo, 1988). Considerando esta interconexión entre flexibilidad y velocidad de reacción, es posible interpretar que las distintas velocidades de transición de hemicromo para meta-Hb, y de sorción de agua por el film, reflejan la dependencia de la flexibilidad sobre la estructura proteica y sobre la sorción de agua. En una primera aproximación es posible considerar que una mayor flexibilidad implica una mayor velocidad de reacción y viceversa. De esta forma, las dos poblaciones cinéticamente distintas reflejan estructuras con distinta flexibilidad. Esta interrelación entre flexibilidad/velocidad favorece la interpretación de que las dos poblaciones cinéticas estén formadas por las cadenas α y β de la Hb, y es justificada por el hecho de que las distintas cadenas del tetrámero Hb presentan distinta flexibilidad (Mayo & col., 1983).

De acuerdo a los argumentos aquí presentados, podemos suponer que el comportamiento bifásico observado en las cinéticas de reconversión de hemicromo en meta-Hb y en la sorción de agua es debido fundamentalmente a dos poblaciones estructurales formadas por las cadenas α y β de la Hb. Según nuestros resultados, una población reacciona 11-14 veces más rápido que la otra, y en cada población el proceso de reconversión de especies es 4-5 veces más rápido que la sorción de agua (ver Tabla 3.2).

De lo expuesto hasta aquí, podemos decir que el agua de hidratación de la globina afecta la estructura de la Hb y de la Mb, al menos en la región del grupo hemo. Considerando que la deshidratación de proteínas está constituida por varios tipos de agua

desde el punto de vista de sus propiedades estructurales y dinámicas, una cuestión importante es saber cual de estas agua es la responsable de la transición conformacional observada en la meta-Hb durante la alteración de la hidratación.

La determinación simultánea de la cantidad de agua ligada al film equilibrado a una dada humedad relativa, y de la conformación proteica asociada, permite obtener la isoterma de sorción de agua, esto es la cantidad de agua sorbida por el film de hemicromo/meta-Hb en función de la h. r. a la que es equilibrado (ver Figura 3.5), y la fracción de meta-Hb presente en el film a esas mismas humedades (ver Figura 3.7). De estas curvas es posible observar que la proteína se comporta como un material distinto luego del secado total en P_2O_5 . Una vez que el film es completamente deshidratado las curvas de sorción de agua y de fracción de meta-Hb presentan el comportamiento de histéresis. Puede verse en nuestros resultados que cuando la proteína totalmente seca es rehidratada en 98 % h. r., ésta no recupera el total de la cantidad de agua de hidratación que poseía inicialmente cuando el film estaba equilibrado a la misma humedad, antes de ser completamente deshidratado (una irreversibilidad semejante encontramos para la muestra de meta-Mb). Esto es análogo a lo que ocurre con la fracción de meta-Hb presente en el film. Los valores de hidratación y de la fracción de meta-Hb presente, obtenidos en el experimento con el film de meta-Hb/hemicromo equilibrado con una h. r. de 98 %, corresponden respectivamente a $n_w = 1510,7$ mol H_2O /mol Hb ($h = 0,421$ gr H_2O / gr Hb) y $f_{meta-Hb} = 0,80$ para el film nativo; y a $n_w = 1419,8$ mol H_2O /mol Hb ($h = 0,3956$ gr H_2O / gr Hb) y $f_{meta-Hb} = 0,58$ para el film previamente secado y rehidratado. Los parámetros de sorción mostrados en la Tabla 3.3 muestran que el número de sitios primarios de sorción de agua, N , decrece luego del secado. Esto sugiere que luego de la deshidratación total se producen cambios conformacionales dramáticos e irreversibles. Esta irreversibilidad no se observa cuando el film es deshidratado hasta una humedad del 7 %, que corresponde a un contenido de agua crítico $n_{wr} \simeq 226$ mol H_2O /mol Hb ó $h_r \simeq 0,0631$ gr H_2O /gr Hb, abajo del cual la Hb sufre cambios conformacionales irreversibles.

La isoterma de sorción de agua y la curva de la fracción de meta-Hb en función de la h. r., nos permiten obtener la curva de equilibrio entre meta-Hb y hemicromo en función de la hidratación. Esta curva, mostrada en la Figura 3.8, muestra el intervalo de los valores de hidratación en el cual ocurre la transición entre las especies hemicromo y meta-Hb. El valor de hidratación a partir del cual sólo la especie meta-Hb está presente no es posible obtenerlo de la gráfica, este valor determinaría la hidratación crítica superior, h_s ó n_{ws} ,

necesaria para la estabilización de la estructura normalmente observada en solución. Sólo podemos afirmar que este valor es mayor que 0,421 gr H₂O/ gr Hb ó 1510,7 mol H₂O/ mol Hb para el film nativo, es decir para el film no deshidratado aún completamente. El valor de hidratación $h_{1/2}$ ó $n_{w1/2}$, determinado por la Figura 3.8, en el cual los estados hemicromos y meta-Hb coexisten equitativamente, es aproximadamente igual a 0,31 gr H₂O/ gr Hb ó 1110 mol H₂O/ mol Hb para el film nativo. Por otra parte, el valor de hidratación crítico inferior h_c ó n_{wc} , abajo del cual solo la especie hemicromo está presente, se encuentra próximo a 0,17 gr H₂O/ gr Hb ó 600 mol H₂O/ mol Hb

Tabla 4.1 : Valores de hidratación críticos para la meta-Hb. Se muestra también el porcentaje de ocupación de sitios primarios, Π , correspondiente a los valores de hidratación críticos.

		Π
n_{wr}	226 mol H ₂ O/mol Hb	66 %
n_{wc}	600 mol H ₂ O/mol Hb	98 %
$n_{w1/2}$	1110 mol H ₂ O/mol Hb	99 %
n_{ws}	>1510 mol H ₂ O/mol Hb	99 %

Llama la atención nuestro resultado que la estructura de la meta-Hb sea sensible a perturbaciones de la hidratación en niveles de contenido de agua tan altos como 1510 mol H₂O/mol Hb. Esta cantidad de agua de hidratación, definida como agua retenida por la proteína después de un cierto procedimiento de secado, es mayor que la cantidad de agua necesaria para completar la hidratación de esta proteína, que medida por diferentes técnicas se encuentra entre 1000-1500 mol H₂O/mol Hb (Kuntz & Kauzmann, 1974; Hopfinger, 1977; Wei & col., 1994). Sin embargo, este resultado puede justificarse puesto que cada una de estas técnicas consideran distintas definiciones del agua de hidratación; como por ejemplo: el agua que no contribuye a la permitividad dieléctrica a cierta frecuencia, el agua que acompaña a la proteína en su movimiento durante los procesos de sedimentación, el agua que produce ensanchamiento en las líneas de RMN, el agua que no congela a 0 °C, el agua que aparece fija en los experimentos de difracción de rayos X, etc. Cada una de estas definiciones dará una cantidad de agua de hidratación diferente pues cada una de ellas actúa en una escala de tiempo distinta (Grigera, 1972). Si consideramos que el agua de hidratación está constituida por la totalidad de moléculas de agua perturbadas por la proteína, cada una de las definiciones citadas subevalúan la cantidad de agua de hidratación real, puesto que

cada técnica determina solo el agua perturbada según la interacción a la que hace referencia el método. Estas consideraciones pueden explicar porque en nuestros experimentos la estructura de la meta-Hb es desestabilizada en niveles de hidratación superiores a los atribuidos a esta proteína.

Nuestro estudio del equilibrio meta-Hb/hemicromo, en función de la hidratación, sugiere otro aspecto importante para la comprensión del papel desempeñado por el agua de hidratación. Este se refiere al tipo de agua de hidratación responsable de la inducción del cambio conformacional observado en nuestros experimentos. El intervalo de hidratación observado para el film nativo, en el cual las especies hemicromo y meta-Hb están en equilibrio, comprende aproximadamente la región que va de 600 mol H₂O/mol Hb hasta valores superiores a 1510 mol H₂O/mol Hb. Los resultados mostrados en la Tabla 3.4 permiten observar que, para contenidos de agua aproximadamente iguales o mayores a 600 mol H₂O/mol Hb, el porcentaje Π de ocupación de sitios primarios de sorción alcanza prácticamente su máximo valor de saturación. Esto quiere decir que, para la Hb que no fue aún completamente deshidratada, se requiere una cantidad mínima cercana a 600 mol H₂O/mol Hb para completar la primera capa de hidratación. Esta cantidad de agua crítica, n_{wc} , es consumida por la Hb para saturar los sitios proteicos cargados eléctricamente y para el recubrimiento de los sitios polares. Cantidades mayores de agua sorbida por la proteína formarán las otras capas de hidratación en las cuales el agua es del tipo estructurada. Por lo tanto, de acuerdo al intervalo de hidratación en el cual ocurre la transición hemicromo \rightleftharpoons meta-Hb, podemos concluir que la estructura de la meta-Hb es sensible a perturbaciones en el agua del tipo estructurada. Para contenidos de agua menores a n_{wc} , donde comienzan a aparecer sitios primarios de sorción vacíos, solo se encuentra presente la forma hemicromo. Esta especie solo puede convertirse a la forma meta-Hb una vez que esté completa la primera capa de hidratación, la que otorga la flexibilidad necesaria a la proteína para que pueda producirse el cambio conformacional. A medida que se van formando las capas de hidratación superiores, se produce un desplazamiento del equilibrio hacia la forma meta-Hb, que es la estructura característica de la proteína en solución.

Otra cuestión importante, sugerida por nuestros estudios del equilibrio meta-Hb/hemicromo en función de la hidratación, se refiere a las irreversibilidad producida por el secado total de la proteína. Nuestros resultados muestran que cuando la meta-Hb es deshidratada por debajo del contenido de agua crítico, n_{wr} , de aproximadamente 226 mol H₂O/mol Hb, la proteína sufre cambios dramáticos e irreversibles. Según los valores

obtenidos, presentados en la Tabla 3.4, para contenidos de agua inferiores a n_{wr} el porcentaje de ocupación Π de los sitios primarios de sorción decrece significativamente, desde aproximadamente el 66 % al 0 %, correspondiendo este último porcentaje al secado total. De acuerdo a estos resultados, el vaciamiento total de los sitios primarios de sorción, los que son identificados con la primera capa de hidratación, produce cambios irreversibles en la proteína. Un comportamiento similar fue observado en los estudios de hidratación de meta-Mb realizados por Grigera & Mogilner en 1982. Estos estudios, realizados mediante las isothermas de sorción de agua y RMN, indican que la retirada del agua de los sitios primarios, identificada con la primera capa de hidratación, es la responsable de la irreversibilidad observada en la deshidratación. De esta manera, la irreversibilidad observada es debida a que el agua, una vez retirada de la primera capa de hidratación, no se reacomoda en la misma forma que poseía inicialmente, antes de ser deshidratada (Grigera & Mogilner, 1982; Mogilner 1989; Grigera, Blum, & Stanley).

La irreversibilidad observada en nuestros estudios de deshidratación de meta-Hb muestra que cuando la proteína es deshidratada por debajo del valor n_{wr} se produce una formación irreversible de hemicromo. De lo visto hasta aquí, podemos suponer que el agua reacomodada en la primera capa, luego de la rehidratación previo secado, estabiliza una forma de hemicromo que no es reconvertida a meta-Hb cuando la muestra es completamente rehidratada. Según esta hipótesis, nuestros resultados experimentales permiten suponer que en la rehidratación luego del secado total, la muestra no recupera la cantidad de agua ligada a 98 % h. r. debido a la formación irreversible de hemicromo, el que presentaría una menor cantidad de agua ligada respecto a la forma meta-Hb. Teniendo en cuenta que solo las dos especies, hemicromo y meta-Hb están presentes en el film, podemos considerar que el contenido de agua n_w , observado a 98 % de h. r. antes y luego del secado total, está constituido por el aporte de la fracción de meta-Hb hidratada y por la fracción de hemicromo, hidratado a la misma humedad. De acuerdo a nuestros valores experimentales, esta consideración arroja valores de hidratación a 98 % h. r. de 1180 mol H₂O/mol Hb para la especie hemicromo y 1593 mol H₂O/mol Hb para la especie meta-Hb. Estos resultados sugieren que el desplazamiento producido por la histidina E7 en la dirección del hemo para la formación de hemicromo, produce una disminución significativa del área superficial accesible al solvente (ASA), comparada con la meta-Hb. De esta forma, el desplazamiento de la histidina E7 estaría acompañado por distorsiones significativas en la estructura de la globina, al menos en la región próxima al hemo.

Las discusiones realizadas aquí muestran al agua fuertemente involucrada en la estabilización de estructuras. La primera capa de hidratación sería la responsable de otorgar la flexibilidad necesaria a la Hb para que ocurra la transición conformacional observada a medida que se van completando las capas de hidratación superiores. El vaciamiento y el relleno de la primera capa produciría una mayor rigidez en las cadenas polipeptídicas que se manifiesta en la formación irreversible de hemicromo observado luego del secado total. Esta rigidez producida por el secado sería consecuencia de la disminución del número de sitios primarios de sorción de agua N , ya que al deshidratar completamente la proteína algunos de estos sitios interactúan entre sí, impidiendo que luego, al rehidratar la proteína, sean ocupados por el agua. Probablemente esto sea la causa de la estabilización de una forma de hemicromo que no es reconvertida a meta-Hb luego de la rehidratación.

4.1.2) *Agua y función*

Las medidas de unión de oxígeno y captación de agua por el film de Hb, realizadas en forma independiente y simultánea usando espectroscopia óptica y la microbalanza de cuarzo, muestran la incorporación de un gran número de moléculas de agua de hidratación a la Hb durante el transcurso de la oxigenación. Esta conclusión fue obtenida anteriormente mediante análisis termodinámicos de la dependencia de la afinidad por el O_2 de la Hb con la actividad del agua en la solución, siendo esta ajustada cambiando la concentración de diferentes solutos neutros en la solución (Colombo, Rau, & Parsegian, 1992; Colombo & Bonilla-Rodrigues, 1996; Colombo & Seixas, 1999). De los análisis realizados por Colombo & col., puede verse que la Hb completamente oxigenada presenta una mayor hidratación comparada con el estado completamente desoxigenado. Esta diferencia de hidratación, Δn_w , corresponde aproximadamente a 70 moléculas de agua cuando la solución proteica contiene más de 50 mM NaCl (Colombo & Seixas, 1999). También ha sido mostrado que la oxigenación de la Hb en solución libre de sales es acompañada por la unión de sólo 25 moléculas de agua, lo que sugiere que la conformación de la desoxi-Hb es dependiente de la unión o condensación de iones (Colombo & Seixas, 1999). El hecho de que la hidratación de la Hb sea susceptible a la concentración de aniones permite contrastar críticamente la determinación de la diferencia de hidratación Δn_w realizada mediante el método de estrés osmótico (OS) con las medidas de masa *in situ* realizadas en nuestro trabajo. Los valores de Δn_w determinados en presencia y en ausencia de NaCl, obtenidos por ambos métodos, concuerdan cuantitativamente. Este resultado prueba que la contribución energética de la solvatación al equilibrio de una reacción bioquímica puede ser determinado

cuantitativamente en solución acuosa utilizando el método de estrés osmótico. Por otra parte, está claramente demostrado el gran alcance del OS como herramienta para probar cambios conformacionales funcionales de proteínas en solución inducidos por reguladores alostéricos.

Los estudios realizados sobre la influencia del NaCl y de otras sales en la hidratación de la Hb durante la oxigenación, sugieren que el control funcional del Cl⁻ sobre la Hb es realizado modulando la conformación desoxi-Hb (Bonaventura & col., 1998; Colombo & Seixas, 1999). La Figura 3.11 muestra que la desoxi-Hb en ausencia de aniones presenta una cantidad mayor de agua de hidratación comparada con la desoxi-Hb en presencia de sal. Esta diferencia en la cantidad de agua de hidratación entre la desoxi-Hb sin y con aniones Cl⁻ ligados corresponde aproximadamente a 50-60 moléculas de H₂O. Este resultado presenta un buen acuerdo con el inferido previamente por Colombo & Seixas en 1999, en sus análisis sobre la influencia de aniones en el cambio de hidratación Δn_w , determinado en solución, ocurrido durante la oxigenación de la Hb. En este trabajo Colombo & Seixas han asumido que la hidratación intrínseca de la oxi-Hb no cambia con la presencia de NaCl, mientras que la desoxi-Hb coexiste en dos conformaciones alternativas con distinta hidratación implícita. Los resultados mostrados en la Figura 3.11 concuerdan con esa suposición. También ha sido propuesto que las dos estructuras de la desoxi-Hb, con y sin aniones ligados, presentan diferencias en sus afinidades intrínsecas por el oxígeno. Las Figuras 3.10a y 3.10b muestran que la constante de tiempo cinética para la unión de O₂ y captación de agua de la desoxi-Hb es aproximadamente dos veces mayor para la muestra en presencia de NaCl, lo que indica que la desoxi-Hb sin aniones ligados tiene mayor afinidad por el O₂ comparada con la desoxi-Hb con aniones ligados. Estos estudios sugieren que la interacción del Cl⁻ con la desoxi-Hb produce un incremento en la energía de activación para la unión del O₂, como así también para los cambios estructurales y de hidratación producidos por la unión del oxígeno. Estos resultados se suman a otras evidencias experimentales en las que se muestra que una descripción completa del mecanismo de la regulación alostérica de la función de la Hb, realizado por ligantes heterotrópicos tales como protones y diferentes aniones, requiere la incorporación de un tercer estado funcional de la Hb (Minton & Imai, 1974; Ackers & col., 1992).

Con el objeto de investigar los cambios estructurales en la desoxi-Hb inducidos por la unión del Cl⁻, Seixas & col. cristalizaron la desoxi-Hb en total ausencia de aniones (Seixas, de Azevedo, & Colombo, 1999). La estructura de este cristal, refinada a 1,8 Å de resolución, presenta la misma estructura cuaternaria que el estado canónico *T*, el cual es

característico de la desoxi-Hb cristalizada en presencia de sales (Perutz, 1989). Sin embargo, el área superficial accesible al solvente (ASA) computada para la desoxi-Hb completamente libre de aniones, identificada como estado plástico *P* (Colombo & Seixas, 1999), es intermedia entre el ASA computada para la desoxi-Hb cristalizada en presencia de sal (Kavanaugh & col., 1992) y el ASA computada para las estructuras de la oxi-Hb (Perutz, 1989; Silva & col., 1992). Además, los cambios en el ASA entre los estados *T* y *P*, y entre los estados *P* y *R*, presentan buen acuerdo con las diferencias de hidratación medidas en nuestro trabajo y con las obtenidas en solución mediante el método OS (Colombo, Rau, & Parsegian, 1992; Colombo & Bonilla-Rodrigues, 1996; Colombo & Seixas, 1999).

En trabajos realizados en 1993 y 1994, Perutz & col. postularon que la regulación de la afinidad del oxígeno por la Hb en presencia de Cl^- ocurre a través de interacciones electrostáticas no específicas. La acción del ión Cl^- consiste en neutralizar el exceso de cargas positivas presentes en la cavidad central de la Hb, a través de condensación iónica de las cargas positivas de los residuos con el ión cloro (Perutz & col., 1993; 1994). El mecanismo propuesto por Perutz está fundamentado en la existencia de un exceso de cargas positivas, localizadas en la cavidad central de la Hb humana. Este exceso de cargas positivas, representado en la Figura 4.1 es generado por ocho residuos catiónicos pertenecientes a las cadenas α (valina 1, lisina 99, e histidina 103) y a las cadenas β (valina 1, histidina 2, lisina 82, arginina 104, e histidina 123), y por tres residuos aniónicos de las cadenas α (aspartato 95 y 126) y de las cadenas β (glutamato 101).

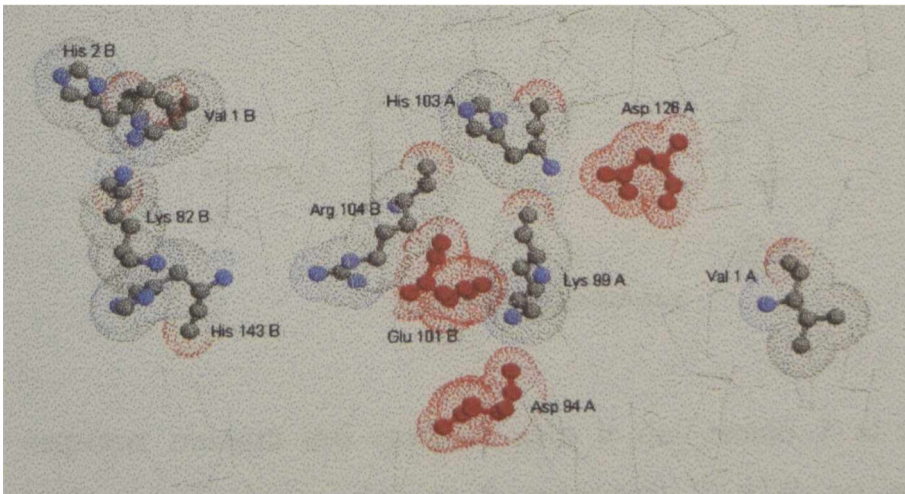
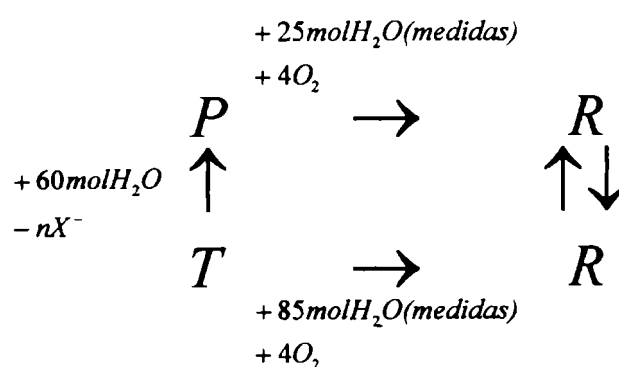


Figura 4.1 : Corte transversal de la cavidad central de la Hb (coordenadas de la oxi-Hb R2 “low salt”, en 100 mM NaCl, extraídas del PDB). Los residuos representados en azul y en color ceniza representan los aminoácidos cargados positivamente, mientras que los residuos representados en rojo corresponden a los aminoácidos cargados negativamente. Los residuos representados corresponden solamente a las cadenas α_1 y β_1 . Estos mismos residuos son encontrados en las cadenas α_2 y β_2 , que juntos suman 16 cargas positivas y 6 cargas negativas.

El exceso de cargas positivas mostrado en la Figura 4.1, también es observado en hemoglobinas de otras especies, y promueve una repulsión electrostática entre estas cargas desestabilizando la estructura *T* de la Hb, desplazando el equilibrio conformacional para la estructura *R* de alta afinidad por el oxígeno, aumentando la afinidad de la Hb por el O_2 . La acción del ión Cl^- sería la de producir un blindaje de las cargas positivas de la cavidad central de la Hb, disminuyendo la fuerza de repulsión electrostática entre los residuos, desplazando el equilibrio alostérico conformacional de la proteína para el estado *T*, de baja afinidad por el oxígeno. Para fundamentar esta hipótesis, Perutz & col. en 1994 se basaron en estudios de oxigenación de hemoglobinas mutantes en los que eliminaron uno o más de los residuos que contribuyen con las cargas positivas de la cavidad. Estas investigaciones mostraron que el efecto de los iones cloro sobre la afinidad de la Hb por el oxígeno disminuye con el número de residuos eliminados, y que lo inverso también es verdadero. Por otra parte, Colombo & col. en 1994 realizaron una reevaluación del efecto alostérico del Cl^- , donde observan que para cada Cl^- liberado por la oxigenación de la Hb en la transición $T \rightarrow R$, aproximadamente 65 moléculas de agua son ligadas a la proteína con la unión de las cuatro moléculas de O_2 (Colombo & col., 1994).

El panorama presentado hasta aquí, junto con los resultados obtenidos en este trabajo, sugiere que la unión de aniones Cl^- a la forma desoxi-Hb promueve un cambio conformacional del estado *T* canónico, con aniones ligados, hacia un nuevo estado conformacional *P*, sin aniones ligados, de acuerdo con el siguiente esquema



Este esquema muestra dos caminos para ir del estado *T* al *R*, y describe la coexistencia de la desoxi-Hb en dos conformaciones, *T* y *P*, en equilibrio con la concentración de aniones. De esta manera, el ión Cl^- produce el blindaje de las cargas positivas de la cavidad central de la Hb estabilizando la estructura *T*. La liberación del cloro produce una repulsión electrostática entre estas cargas, aumentando el área superficial accesible al solvente y permitiendo la incorporación de aproximadamente 60 moléculas de agua, de forma de estabilizar la conformación alostérica *P* con mayor afinidad por el O_2 .

Una vez estabilizada esta nueva conformación alostérica, la unión de las cuatro moléculas de oxígeno es acompañada con la incorporación de aproximadamente 25 moléculas de agua, estabilizándose así la conformación *R*. Tanto el camino directo como el indirecto involucran una misma cantidad de agua de hidratación incorporada durante la transición del estado *T* para el estado *R*. De acuerdo a nuestros resultados, la oxi-Hb presenta la misma hidratación independientemente si tiene o no aniones Cl^- ligados. Sin embargo, estudios que hemos realizado con films de oxi-Hb en presencia y en ausencia de NaCl, equilibrados con una humedad relativa de 98 %, muestran que la oxi-Hb con Cl^- ligados presenta una mayor susceptibilidad a la oxidación comparada con la oxi-Hb libre de aniones. Por otra parte, la desoxigenación del film de oxi-Hb en ausencia de NaCl, a 98 % h.r., es más lenta que la observada para el film de oxi-Hb en presencia de NaCl. Estas observaciones muestran que, aunque presenta una misma superficie accesible al solvente, la oxi-Hb libre de aniones es más estable que cuando tiene aniones ligados, esta estabilidad es tanto respecto a la oxidación como a la desoxigenación.

Los resultados presentados muestran el fuerte rol del agua como modulador de la transición $T \rightarrow R$, e indican que el agua actúa como un activador alostérico heterótrópico, incorporado durante la oxigenación de la Hb. Este comportamiento no es observado en la oxigenación de la Mb.

Las medidas termodinámicas realizadas con el método OS y las determinaciones directas realizadas en este trabajo, para la captación de agua que acompaña los cambios conformacionales inducidos por la unión de O_2 en la Hb, se diferencian por el hecho de que las primeras son una medida de la contribución de la hidratación al potencial químico de las especies solubles de Hb, es decir, miden la contribución del agua a la energética de la reacción; mientras que las segundas constituyen una medida directa de cuantas moléculas de agua son físicamente ligadas a la superficie de una especie conformacional particular, en una condición termodinámica (muy alta humedad relativa) que aproxima el estado en solución. El acuerdo observado entre estas dos determinaciones sugiere que la contribución del agua al potencial químico de un dado estado conformacional proteico puede ser evaluado mediante la teoría de enlace macromolecular, originalmente propuesta por Schellman en 1975. De acuerdo a este formalismo, para cada macromolécula *M* interactuando con *n* moléculas de un ligante *L* puede escribirse la siguiente expresión



donde el potencial químico μ_P de la proteína ligada está dado por

$$\mu_P = \mu_P^0 + RT \ln(M) - RT \ln \sum_{i=0}^n \beta_i a_L^i \quad (4.3)$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, M es la concentración de proteína no ligada, β_i es la constante referida a la unión del i -ésimo ligante, y a_L la actividad del ligante. La sumatoria en la ecuación (4.3), representa la contribución a la energía libre de la unión del ligante L a los n sitios de unión de la macromolécula (Schellman, 1975). Específicamente, esta sumatoria corresponde a la *unión polinomial*, anteriormente propuesta por Wyman para describir los efectos de la unión de ligantes en procesos bioquímicos (Wyman, 1964). El acuerdo cuantitativo entre la diferencia de hidratación en las formas oxi y desoxi-Hb, determinado en solución a través de la ecuación (1.3) y directamente con la microbalanza de cuarzo, sugiere que la energía libre de hidratación de la proteína puede aproximarse mediante una *unión polinomial* a n sitios equivalentes e independientes. De esta manera, la *unión polinomial* del agua a n_w sitios equivalentes e independientes de la proteína, puede escribirse aproximadamente como $RT \ln \sum_{i=0}^{n_w} (k_w^i a_w^i)$, donde k_w^i es una constante proporcional a la fuerza de unión del agua al i -ésimo sitio. En solución acuosa, esta energía libre de interacción del agua con la macromolécula toma la forma simple dada por

$$RT \ln \sum_{i=0}^{n_w} k_w^i a_w^i = n_w RT \ln(k_w a_w) \quad (4.4)$$

dado que cada sitio de hidratación expuesto al solvente puede ser hidratado. En consecuencia, el potencial químico de la proteína en una solución con actividad de agua a_w está dado por

$$\mu_P = \mu_P^0 + RT \ln(M_w) - RT n_w \ln(a_w) \quad (4.5)$$

donde $\ln(M_w) = \ln(M) - n_w \ln(k_w)$, con M_w representando la actividad de la proteína totalmente hidratada a la actividad de agua a_w , y M la concentración de proteína. De acuerdo a la ecuación (4.5), el potencial químico de una macromolécula en solución aumenta con el decrecimiento de a_w . Las medidas extensivas realizadas sobre el control de la estabilidad y de la reacción proteica por cosolventes débilmente interactuantes, muestran que la energía libre para transferir una proteína desde el agua pura a la solución con osmolitos es desfavorable (Timasheff, 1998_a). Estas medidas, analizadas en términos de los parámetros de interacción preferencial $\Gamma_{3,2}$ entre la proteína (especie 2) y el osmolito (especie 3), muestran que la magnitud de la desestabilización proteica es proporcional a la concentración

de soluto y a la superficie proteica expuesta a la solución (Timasheff, 1998_a). Ambos comportamientos son también predichos por la ecuación (4.5), dado que $\ln(a_w)$ es proporcional a la composición de la solución y n_w a la superficie de la proteína expuesta al solvente.

La ecuación (4.5) permite realizar una descripción del efecto del agua sobre el equilibrio entre diferentes conformeros en cada reacción bioquímica. Consideremos dos conformeros N y D , con potenciales químicos μ_N y μ_D , y con números de moléculas de agua ligadas dados por n_w^N y n_w^D , respectivamente. En el equilibrio, los potenciales químicos de ambos conformeros son iguales, y según la ecuación (4.5) obtenemos la expresión

$$\mu_D^0 - \mu_N^0 = RT \ln\left(\frac{[D]}{[N]}\right) - (n_w^D - n_w^N)RT \ln(a_w) = 0 \quad (4.6)$$

tomando en la ecuación (4.6) la derivada del $\ln(K) = \ln([D]/[N])$ respecto del $\ln(a_w)$, obtenemos el número de moléculas ligadas durante la transición, es decir, reproducimos la ecuación (1.3). De esta forma, la ecuación (4.5), cuya derivación es motivada por el acuerdo existente entre las medidas termodinámicas y la determinación directa del cambio de hidratación asociado a la oxigenación de la Hb, da una descripción propia para la contribución de la hidratación al potencial químico de una macromolécula en solución. De este modo, la ecuación (4.5) establece una conexión cuantitativa entre las energías de solvatación de las superficies macromoleculares y la energética de las reacciones bioquímicas

Los resultados descriptos en esta sección muestran al agua fuertemente involucrada en la función de la Hb, y constituyen una demostración experimental de que la hidratación medida con el método OS refleja la contribución termodinámica verdadera del agua ligada a la proteína en la función.

4.2) Conclusiones finales

Los resultados que hemos presentado y discutido en este trabajo de tesis se han referido al agua de hidratación de la hemoglobina. De esta forma, investigamos el agua involucrada en la estabilización de estructuras, y transiciones conformacionales inducidas por la alteración de la hidratación de la Hb; como así también el agua involucrada en la reacción funcional de la Hb.

Con respecto al rol jugado por el agua en la estabilización de estructuras de la hemoglobina, los resultados permiten concluir que:

- El agua de hidratación afecta la conformación de la Hb y de la Mb, y determina el equilibrio entre la conformación típica en solución y la conformación *bis-his*, típica de la globina deshidratada. La deshidratación de la meta-Hb estabiliza la conformación hemicromo.
- La transición entre las conformaciones hemicromo y meta-Hb no posee estados conformacionales intermedios.
- La meta-Hb está compuesta por dos poblaciones estructurales con características cinéticas distintas para la transición meta-Hb \rightleftharpoons hemicromo.
- La medida de las constantes de velocidad de la transición meta-Hb \rightleftharpoons hemicromo inducida por la alteración de la hidratación, otorga información sobre la flexibilidad intrínseca de las poblaciones estructurales que componen la Hb. En este aspecto, podemos decir que la Hb se compone de una población más flexible que otra.
- Una población reacciona aproximadamente 11-14 veces más rápido que la otra.
- Para cada población, el proceso de reconversión de hemicromo en meta-Hb es aproximadamente 4-5 veces más rápido que la sorción de agua.
- El proceso de deshidratación de la meta-Hb es reversible cuando esta es deshidratada hasta un 7 % de h.r., que corresponde a un contenido de agua crítico $n_{wr}=226$ mol H₂O/mol Hb.
- Para contenidos de agua menores a $n_{wr}=600$ mol H₂O/mol Hb solo existe la conformación hemicromo.
- El agua de hidratación del tipo estructurada (multicapa) es la responsable de otorgar la flexibilidad necesaria para que se produzca la transición meta-Hb \rightleftharpoons hemicromo.
- La deshidratación de la meta-Hb por debajo del valor crítico $n_{wr}=226$ mol H₂O/mol Hb produce cambios irreversibles.
- El vaciamiento de los sitios primarios de sorción de agua (monocapa) de la meta-Hb produce irreversibilidad. Tanto la fracción de meta-Hb como la cantidad de agua ligada al film no recuperan los valores de equilibrio en 98 % h.r. obtenidos antes de deshidratar.
- En la rehidratación luego del secado total, la meta-Hb no recupera la cantidad de agua ligada debido a la formación irreversible de hemicromo, el que presenta una menor cantidad de agua ligada respecto a la forma meta-Hb.

- La formación de hemicromo requiere de ciertos reordenamientos estructurales para que la histidina distal se una al hierro en la sexta posición de coordinación. Estos reordenamientos producen una disminución significativa del área superficial accesible al solvente, comparada con la forma meta-Hb.

En cuanto al rol del agua en la actividad funcional de la hemoglobina, los resultados obtenidos permiten concluir que:

- La captación de oxígeno por el film de Hb, a 98 % h. r., es acompañada por un aumento en la cantidad de agua de hidratación. Esto no ocurre durante la oxigenación de la Mb.
- La unión del O₂ y de la captación de agua por la Hb siguen una cinética de primer orden, con una misma velocidad. Existe un mecanismo común que regula ambos procesos de unión.
- Durante la transición de la forma desoxi a la forma oxi, aproximadamente 85 moléculas de agua se unen a la hemoglobina cuando esta se encuentra ligada a aniones Cl⁻. Mientras que, para la misma transición, aproximadamente 25 moléculas de agua se unen a la Hb sin Cl⁻ ligados.
- La desoxi-Hb libre de aniones involucra una menor cantidad de agua de hidratación incorporada al pasar a la forma oxi, y posee una mayor afinidad por el O₂, comparada con la desoxi-Hb con Cl⁻ ligados. Los aniones Cl⁻ hacen más estable la forma desoxi.
- Además de modular el equilibrio entre las conformaciones *T* y *R* clásicas, la unión de aniones a la forma desoxi-Hb promueve un cambio conformacional entre el estado canónico *T* y un nuevo estado conformacional plástico *P*.
- El estado desoxigenado *P* posee una mayor cantidad de agua de hidratación y una mayor afinidad por el O₂, comparado con el estado desoxigenado *T*.
- El agua actúa como activador alostérico heterotrópico de la transición *T*→*R*, siendo incorporada a la Hb durante la oxigenación.
- Estos resultados presentan un buen acuerdo con los obtenidos por otros autores mediante el método de estrés osmótico.
- Este acuerdo hace explícita la contribución energética de la hidratación al potencial químico μ_P de la macromolécula: $\mu_P = \mu_P^0 + RT \ln(M_w) - RTn_w \ln(a_w)$. Esta relación permite una descripción cuantitativa del efecto de la unión de ligantes y de la hidratación en un equilibrio bioquímico, y demuestra que el uso del estrés osmótico es un camino plausible para cambiar la actividad de agua percibida por una reacción bioquímica, y que

el corrimiento del equilibrio producido por el cambio en la actividad de agua puede ser racionalizado en términos de la cantidad de agua incorporada en la reacción.

Los estudios presentados en esta tesis muestran al agua fuertemente involucrada en la estructura y función de la hemoglobina

REFERENCIAS

ACKERS G.K., DOYLE M.L., & DAUGHERTY M.A., (1992); *Molecular code of cooperativity in hemoglobin*, Science, 255, pp. 54-63.

ALTER G.M., (1983); *Comparison of solid and solution state protein structures. Photoacoustic study of solid state bovine methemoglobin derivatives*, J. Biol. Chem., 258 (24), pp. 14960-14965.

ANTONINI E. & BRUNORI M., (1971); *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*, North-Holland Publ., Amsterdam.

ANUSIEM A.C.I., BEETLESTONE J.G., KUSHIMO J.B., & OSHODI A.A., (1976); *Spectral evidence for two forms of acid ferrihemoglobin*, Arch. of Biochem. and Biophys., 175, pp. 138-143.

ARAKAWA T. & TIMASHEFF S.N., (1985); *Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins*, Biochemistry; 24 (24), pp. 6756-6762.

BALDWIN J.M. & CHOTHIA C., (1979); *Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism*, J. Mol. Biol., 129, pp. 158-174.

BANERJEE R. & CASSOLY R., (1969); *Preparation and properties of the isolated alpha and beta chains of human hemoglobin in the ferri state. Investigation of oxydation-reduction equilibria*, J. Mol. Biol., 42 (2), pp. 337-349.

BENESH R., BENESH R.E., & YU C.I., (1969); *The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration*, Biochemistry, 8 (6), pp. 2567-2571.

BERENDSEN H.J.C., (1975); *Specific interactions of water with biopolymers*, Water, a comprehensive treatise, vol. 5, Edited by Felix Franks, Plenum Press, New Yor & London, pp. 293-349.

BOHM S. & ABATUROV L.V., (1977); *Structural changes of met-haemoglobin by dehydration*, FEBS Lett. 1977, 77(1), pp.21-24.

BONAVENTURA C., TESH S., FAULKNER K.M., KRAITER D., & CRUMBLISS A.L., (1998); *Conformational fluctuations in deoxy hemoglobin revealed as a major contributor to anionic modulation of function through studies of the oxygenation and oxidation of hemoglobins A0 and Deer Lodge beta2(NA2)His -> Arg*, *Biochemistry*, 37 (2), pp. 496-506.

BOWEN W.J., (1949); *The Absorption spectra and extinction coefficients of myoglobin*, *J. Biol. Chem.*, 179 (1), pp. 235-245.

BRAUSSE G., MAYER A., NEDETZKA T., SCHLECHT P., & VOGEL H., (1968); *Water adsorption and dielectric properties of lyophilized hemoglobin*, *J. Phys. Chem.*; 72 (9), pp. 3098-3105.

BROWN M.P., GRILLO A.O., BOYER M., & ROYER C.A., (1999); *Probing the role of water in the tryptophan repressor-operator complex*, *Protein Sci.*, 8 (6), pp. 1276-1285.

BRUNAUER S., (1945); *The adsorption of gases and vapors*, Princeton University Press, New Jersey.

BRUNORI M., TAYLOR J.F., ANTONINI E., WYMAN J., & ROSSI-FANELLI A., (1967); *Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins*, *J. Biol. Chem.*, 242 (10), pp. 2295-2300.

BUCCI E., GRYCZYNSKI Z., RAZINSKA A., & KWANSA H., (1998); *Entropy driven intermediate steps of oxygenation may regulate the allosteric behavior of hemoglobin*, *Biophys. Journal*, 74, pp. 2638-2648.

BUCHER D.J. & BROWN W.D., (1971); *Action of chloroform and its chlorinated analogs on hemoproteins*, *Biochemistry*, 10 (23), pp. 4239-4246.

BULL H.B., (1944); *Adsorption of water vapor by proteins*, *J. Am. Chem. Soc.*, 66, pp. 1499-1507.

CADY W.G., (1964); *Piezoelectricity*, Vol. 2, p. 453, Dover, New York.

CANTOR CH.R. & SCHIMMEL P.R., (1980.); *Techniquesw for the study of biological structure and function*, *Biophysical Chemistry Part II*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

CANTOR CH.R. & SCHIMMEL P.R., (1980); *The behavior of biological macromolecules*, Biophysical Chemistry Part III, W. H. Freeman and Co., New York.

CAUGHEY W.S., FUJIMOTO W.Y., BEARDEN A.J., & MOSS T.H., (1966); *Mossbauer spectroscopic evidence for low-spin iron in dehydrated metmyoglobin*, Biochemistry, 5 (4), pp. 1255-1562.

CHOTHIA C., WODAK S., & JANIN J., (1976); *Role of subunit interfaces in the allosteric mechanism of hemoglobin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73 (11), pp. 3793-3797.

COLOMBO M.F., (1988); *Aspectos conformacionais e dinâmicos dependentes da hidratação de hemoproteínas*, Tese, Universidade de São Paulo.

COLOMBO M.F. & SANCHES R., (1990); *Hydration-dependent conformational states of hemoglobin. Equilibrium and kinetic behavior*, Biophys. Chem., 36, pp. 33-39.

COLOMBO M.F., RAU D.C., & PARSEGAN V.A., (1992); *Protein solvation in allosteric regulation: A water effect on hemoglobin*, Science 256, pp. 655-659.

COLOMBO M.F., RAU D.C., & PARSEGAN V.A., (1994); *Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: The neglected contribution of protein hydration in allostery*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, pp. 10517-10520.

COLOMBO M.F. & BONILLA-RODRIGUEZ G.O., (1996); *The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions*, J. Biol. Chem., 271 (9), pp. 4895-4899.

COLOMBO M.F. & SEIXAS F.A., (1999); *Novel allosteric conformation of human Hb revealed by the hydration and anion effects on O₂ binding*, Biochemistry, 38 (36), pp. 11741-11748.

CURTIS H. & SUE BARNES N., (1999); *Biología*, 5^ª Ed., Editorial Médica Panamericana S.A..

DAVID-SEARLES P.R., MORAR A.S., SAUNDERS A.J., ERIE D.A., & PIELAK G.J., (1998); *Sugar-induced molten-globule model*, Biochemistry, 37 (48), pp. 17048-17053.

DIXON M., (1971); *The acceptor specificity of flavins and flavoproteins. I. Techniques for anaerobic spectrophotometry*, Biochim. Biophys. Acta, 226 (2), pp. 241-258.

EATON W.A. & HOFRICHTER J., (1981): *Hemoglobins*, Methods in Enzimology, 76, pp. 175-261.

EDSALL J.T. & MCKENZIE H.A., (1983); *Water and proteins. II The location and dynamics of water in protein systems and its relation to their stability and properties*, Adv. Biophys., 16, pp. 53-183.

ELEY D.D. & LESLIE R.B., (1968); *Adsorption of water on solid proteins with special reference to haemoglobin*, Adv. in Chem. Phys., 7, pp. 238-258.

FLORIANO W.B., NASCIMENTO M.A.C., DOMONT G.B., & GODDARD W.A., (1998); *Effects of pressure on the structure of metmyoglobin: Molecular dynamics predictions for pressure unfolding through a molten globule intermediate*, Proteins Science, 7, pp. 2301-2313.

FORBES W.H. & ROUGHTON J.W., (1931); *The equilibrium between oxygen and hemoglobin*, J. Physiol., 71, pp. 224-229.

FULLERTON G.D., ORD V.A., & CAMERON I.L., (1986); *An evaluation of the hydration of lysozyme by an NMR titration method*, Biochim. Biophys. Acta 869 (3), pp.230-246.

GARRET R.H. & GRISHLAM C.M., (1995); *Biochemistry: Enzyme specificity and allosteric regulation*, Orlando, Saunders College Publishing, pp. 387-423.

GRIGERA J.R., (1972); *Estado y estructura del agua asociada en sistemas biológicos. Estudios sobre hidratación de colágeno*, Tesis, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

GRIGERA J.R., (1976); *Introducción a la biofísica del agua*, EUDEBA SEM..

GRIGERA J.R. & MASCARENHAS S., (1978); *A model for NMR, dielectric relaxation and electric behavior of bound water in proteins*, Studia Biophysica, 73, pp. 19-24.

GRIGERA J.R., (1979); *Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation time in hydrated protein powders. A two site dynamic exchange model*, J. Phys. Chem., 83 (16), pp.2145-2147.

GRIGERA J.R. & BERENDSEN H.J.C., (1979); *The molecular details of collagen hydration*, Biopolymers, 18, pp. 47-57.

GRIGERA J.R. & MOGILNER I.G., (1982); *Water bridges in myoglobin*, en *Biophysics of Water*, Ed. by Felix Franks, John Wiley & Sons Limited, Chichester-NewYork-Brisbane-Toronto-Singapore, pp. 39-41.

GRIGERA J.R., BLUM L., & STANLEY H.E.; *Biophysics of water*, inédito.

GUGGENHEIM E.A., (1966); *Application of Statistical Mechanics*, Clarendon Press, Oxford.

HAUROWITZ F., (1951); *Hemoglobin, anhydrohemoglobin, and oxyhemoglobin*, J. Biol. Chem., 1993, pp.443-452.

HAIRE R.N. & HEDLUNG B.E., (1977); *Thermodynamic aspects of the linkage between binding of chloride and oxygen to human hemoglobin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (10), pp. 4135-4138.

HOPFINGER A.J., (1977); *Intermolecular interactions and biomolecular organizations*, Wiley-Interscience, New York.

IIZUKA T. & KOTANI M., (1969); *Analysis of thermal equilibrium between high-spin and low-spin states in ferrihemoglobin complexes*, Biochim. Biophys. Acta, 194, pp. 351-363.

JENNINGS P.A. & WRIGHT P.E., (1993); *Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin*, Science 252, pp. 892-896.

KAMIYAMA T., SADAHIDE Y., NOGUSA Y., & GEKKO K., (1999); *Polyol-induced molten globule of cytochrome c: an evidence for stabilization by hydrophobic interaction*, Biochim. Biophys. Acta, 1434 (1), pp. 44-57.

KAVANAUGH J.S., ROGERS P.H., CASE D.A., & ARNONE A., (1992); *High-resolution X-ray study of deoxyhemoglobin Rothschild 37 beta Trp----Arg: a mutation that creates an intersubunit chloride-binding site*, Biochemistry, 31 (16), pp. 4111-4121.

KEILIN D. & HARTREE E.F., (1952); *Effect of drying upon the absorption spectra of haemoglobin and its derivatives*, Nature, 170 , pp. 161-162.

KENDREW J.C., (1961); *The three-dimensional structure of a protein molecule*, Sci. Amer., 205 (6), pp. 96-111.

KENDREW J.C., (1963); *Myoglobin and the structure of proteins*, Science, 139, pp. 1259-1266.

KENNERLEY M.G., (1969); *A technique for the measurement of the water adsorption of small amounts of higroscopic materials*, Polymer, 10, pp. 833-840.

KUNTZ I.D. & KAUZMANN W., (1974); *Hydration of proteins and polypeptides*, Adv. Protein Chem., 28, pp. 239-345.

LADNER R.C., HEIDNER E.J., & PERUTZ M.F., (1977); *The structure of horse methaemoglobin at 2.0 Å resolution*, J. Mol. Biol., 114 (3), pp. 385-414.

LAEMMLI U.K., (1970); *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature, 227, pp. 680-685.

LAMB D.C., OSTERMANN V.E., PRUSAKOV V.E., & PARAK F.G., (1998); *From metmyoglobin to deoxy myoglobin: Relaxations of an intermediate state*, Eur. Biophys. J., 27, pp. 113-125.

LJONES T. & BURRIS R.H., (1972); *Continuous spectrophotometric assay for nitrogenase*, Anal Biochem., 45 (2), pp. 448-52.

MARICIC S., PIFAT G., & PRAVIDIC V., (1964); *Hydration of hemoglobin and its reversible oxygenation*, Ver. Bunsenges. Phys. Chem, 68, pp. 787-793.

MAYO K.H., KUCHEIDA D., PARAK F., & CHIEN J.C., (1983); *Structural of human deoxyhemoglobin and hemochrome investigated by nuclear gamma resonance absorption (Mossbauer) spectroscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 (17), pp. 5294-5296.

MILLS F.C., JOHNSON M.L., & ACKERS G.K., (1976); *Oxygenation-linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves*, Biochemistry, 15 (24), pp. 5350-5362.

MINTON A.P. & IMAI K., (1974); *The three-state model: a minimal allosteric description of homotropic and heterotropic effects in the binding of ligands to hemoglobin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71 (4), pp. 1418-1421.

MOGILNER I.G., (1989); *Estabilidad, conformación e hidratación de proteínas. Adsorción de agua en fase líquida y gaseosa*, Tesis, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

MONOD J., WYMAN J., & CHANGEUX J.P., (1965); *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*, J. Mol. Biol., 12, pp. 88-118.

NEAL M.W. & FLORINI J.R., (1973); *A rapid method for desalting small volumes of solution*, Analytical Biochem., 55 (1), pp. 328-330.

NOBBS C.L., WATSON H.C., & KENDREW J.C., (1966); *Structure of deoxymyoglobin: a crystallographic study*, Nature, 209 (21), pp. 339-341.

OGUNMOLA G.B., ZIPP A., CHEN F., & KAUZMANN W., (1977); *Effects of pressure on visible spectra of complexes of myoglobin, hemoglobin, cytochrome c, and horse radish peroxidase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1), pp.1-4

PAPAEFTHYMIU G.C., HUYNH B.H., YEN C.S., GROVES J.L., & WU C.S., (1975); *Mossbauer studies of Fe^{2+} in anhydrous hemoglobin and its isolated subunits*, J. Chem. Phys., 62 (8), pp. 2995-3001.

PARSEGIAN V.A., RAND R.P., & RAU D.C., (1995); *Macromolecules and water: Probing with osmotic stress*, Energetics of biological macromolecules, Method Enzymol, 259, pp. 43-94.

PARSEGIAN V.A., RAND R.P., & RAU D.C., (2000); *Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, pp. 3987-3992.

PEISACH J., BLUMBERG W.E., & RACHMILEWITZ E.A., (1975); *The demonstration of ferrihemochrome intermediates in heinz body formation following the reduction of oxyhemoglobin A by acetylphenylhydrazine*, Biochem. Biophys. Acta, 393 (2), pp. 404-418.

PERUTZ M.F., (1964); *The hemoglobin molecule*, Sci. Amer., 211 (5), pp. 64-76.

PERUTZ M.F., (1970); *Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin*, Nature, 228, pp. 726-739.

PERUTZ M.F., HEIDNER E.J., LADNER J.E., BEETLESTONE J.G., HO C., & SLADE E.F., (1974); *Influence of globin structure on the state of the heme. 3. Changes in heme spectra accompanying allosteric transitions in methemoglobin and their implications for heme-heme interaction*, *Biochemistry*, 13 (10), pp. 2187-2200.

PERUTZ M.F., (1976); *Structure and mechanism of haemoglobin*, *Br. Med. Bull.*, 32 (3), pp. 195-208.

PERUTZ M.F., (1989); *Mechanism of cooperativity and allosteric regulation in proteins*, *Q. Rev. Biophys.*, 22 (2), pp. 139-237.

PERUTZ M.F., FERMI G., POYART C., PAGNIER J., & KISTER J., (1993); *A novel allosteric mechanism in hemoglobin: Structure of bovine deoxyhemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human hemoglobin*, *J. Mol. Biol.*, 233, pp. 536-545.

PERUTZ M.F., SHIH D., & WILLIAMSON D., (1994); *The chloride effect in human hemoglobin: A new kind of allosteric mechanism*, *J. Mol. Biol.*, 239, pp. 555-560.

PERUTZ M.F., WLIKINSON A.J, PAOLI M., & DODSON G.G., (1998); *The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited*, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27, pp. 1-34.

PLAZA DEL PINO LM. & SANCHEZ-RUIZ J.M., (1995); *An osmolyte effect on the heat capacity change for protein folding*, *Biochemistry*, 34 (27), pp. 8621-8630.

PODJARNY A.D., HOWARD E.I., URZHUMTSEV A., & GRIGERA J.R., (1997); *A multicopy modeling of the water distribution in macromolecular crystals*, *Proteins*, 28 (3), pp. 303-312.

PREISLER R.S., CHEN H.H., COLOMBO M.F., CHOE Y., SHORT B.J.Jr., & RAU D.C., (1995); *The B form to Z form transition of poly(dG-m5dC) is sensitive to neutral solutes through an osmotic stress*, *Biochemistry*, 34 (44), pp. 14400-14407.

RACHMILEWITZ E.A., PEISACH J., & BLUMBERG W.E., (1971); *Studies on the stability of oxyhemoglobin A and its constituent chains and their derivatives*, *J. Biol. Chem.*, 246 (10), pp. 3356-3366.

RACHMILEWITZ E.A., (1974); *Denaturation of the normal and abnormal hemoglobin molecule*, Semin. Hematol., 11 (4), pp. 441-462.

RAND R.P., FULLER N.L., BUTKO P., FRANCIS G., & NICHOLLS P., (1993); *Measured change in protein solvation with substrate binding and turnover*, Biochemistry, 32 (23), pp. 5925-5929.

RECORD M.T.Jr., ANDERSON C.F., & LOHMAN T.M., (1978); *Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity*, Q. Rev. Biophys., 11 (2), pp. 103-178.

ROGER W.E. Jr., PARDANANI A., GIBSON Q.H., PETERSON E.S., & FRIEDMAN J.M., (1996); *Ordered water molecules as key allosteric mediators in a cooperative dimeric hemoglobin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (25), pp. 14526-31.

RUGGIERO NETO J. & COLOMBO M.F., (2000); *Water regulation of actinomycin-D binding to DNA: The interplay among drug affinity, DNA long-range conformation, and hydration*, Biopolymers, 53, pp. 46-59.

RUPLEY J.A., GRATTON E., & CARERI G., (1983); *Water and globular proteins*, Trends in Biochemical Science, 8, pp. 18-22.

SALVAY A.G., MOGILNER I.G., & GRIGERA J.R., (1996); *Efecto del contenido de agua en la sorción de oxígeno por hemoglobina*, XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, Bariloche 2-4 de noviembre de 1996, pp.70.

SALVAY A.G. & GRIGERA J.R., (1997); *Hemoglobin allosteric rupture in the complete dehydration-rehydration process*, III IberoAmerican Congress of Biophysics, Buenos Aires 20-23 de septiembre de 1997, pp. 1.16.

SALVAY A.G. & GRIGERA J.R., (1998); *El agua como regulador alostérico en hemoglobina*, XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, La Plata 6-8 de diciembre de 1998, pp. A.15 (1^{er} Premio: Al mejor trabajo presentado en la XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica).

SALVAY A.G., COLOMBO M.F., & GRIGERA J.R., (1999); *Medidas "in situ" de la cantidad de agua ligada para desoxi y oxihemoglobina humana*, XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, La Cumbre, Córdoba 5-7 de noviembre de 1999, pp 36.

SALVAY A.G., COLOMBO M.F., & GRIGERA J.R., (1999); *Estudios sobre hidratación de metahemoglobina y sus implicancias conformacionales*, XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, La Cumbre, Córdoba 5-7 de noviembre de 1999, pp 37.

SALVAY A.G. & GRIGERA J.R., (2000); *Studies about hydration of hemoproteins: myoglobin and cytochrome c*, IV Biophysics Congress of the Southern Cone, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, Brasil, 19-22 de agosto de 2000, pp. 81.

SALVAY A.G., GRIGERA J.R., & COLOMBO M.F., (2001); *In situ measurements of the hydration of oxy and deoxy-Hb and the contribution of solvation to biological reactions in solution*, para enviar a publicar.

SCHELLMAN J.A., (1975); *Macromolecular binding*, Biopolymers, 14, pp. 999-1018.

SCHNEIDER M.J. & SCHNEIDER A.S., (1972); *Water in biological membranes: adsorption isotherms and circular dichroism as a function of hydration*, J. Membr. Biol., 9 (2), pp. 127-140.

SCHOENBORN B.P. & HANSON J.C., (1980); *Water in biopolymers*, ACS Symposium Series, N 127, Stanley P. Rowland, Editor, 12, pp. 215-224.

SEIXAS F.A., DE AZEVEDO W.F. Jr., & COLOMBO M.F., (1999); *Crystallization and x-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A₀ fully stripped of any anions*, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 55 (11), pp. 1914-1916.

SIDOROVA N.Y. & RAU D.C., (2000); *The dissociation rate of the EcoRI-DNA-specific complex is linked to water activity*, Biopolymers, 53 (5), pp. 363-368.

SILVA M.M., ROGERS P.H., & ARNONE A., (1992); *A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-Å resolution*, J. Biol. Chem., 267 (24), pp. 17248-17256.

STRYER L., (1988); *Biochemistry*, 3th Edition, Ed. Freeman.

TAKANO T., (1977); *Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution. II. Structure of deoxymyoglobin from sperm whale*, J. Mol. Biol., 110 (3), pp. 569-584.

TANFORD C., (1969); *Extension of the theory of linked functions to incorporate the effects of protein hydration*, J. Mol. Biol., 39, pp. 539-544.

TANFORD C., (1973); *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*, Wiley Interscience Publ..

TIMASHEFF S.N., (1998); *Control of protein stability and reaction by weakly interacting cosolvent: the simplicity of the complicated*, Adv. Protein Chem., 51, pp.355-432.

TIMASHEFF S.N., (1998); *In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, pp. 7363-7367.

THIRION C., LARCHER D., CHAILLOT B., LABRUDE P., & VIGNERON C., (1983); *Circular dichroism studies of freeze-drying-induced conformational changes in human hemoglobin*, Biopolymers, 22, pp. 2367-2381.

VAN ASSENDELFT O.W. & ZIJLSTRA W.G., (1975); *Extinction coefficients for use in equations for the spectrophotometric analysis of haemoglobin mixtures*, Analytical Biochemistry 69, pp. 43-48.

VAN LEEUWEN J.W., BUTLER J., & SWALLOW A.J., (1981); *A non-equilibrium state of deoxyhaemoglobin. Temperature-dependence and oxygen binding*, Biochem. Biophys. Acta, 667 (1), pp. 185-196.

VOET D. & VOET J.C., (1995); *Biochemistry*, 2^o ed, Toronto, John Wiley & Sons.

WEI Y.Z., KUMBHARKHANE A.C., SADEGHI M., SAGE J.T., TIAN W.D., CHAMPION P.M., SRIDHAR S., & McDONALD M.J., (1994); *Protein hydration investigations with high-frequency dielectric spectroscopy*, J. Phys. Chem., 98, pp. 6644-6651.

WYMAN J., (1964); *Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look*, Adv. Protein Chem., 19, pp. 223-286.

WYMAN J. & GILL J.S., (1990); *Binding and linkage. Functional chemistry of biological macromolecules*, University Sci. Books, Mill Valley, CA.

ZIPP A. & KAUZMANN W., (1973); *Pressure denaturation of metmyoglobin*, *Biochemistry*, 12 (21), pp. 4217-4228.